RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio de la especie vegetal *Plantago major L* (Llantén) en la forma de tintura, mediante la técnica del granuloma inducido por discos de algodón, teniendo como referencia de que esta especie es utilizada de forma empírica para tratar diversas patologías como es el caso de inflamaciones internas. Para realizar el estudio se emplearon hojas de *Plantago major L* (PmL) mismas que fueron recolectadas en el Barrio Las Palmeras de la parroquia de San Joaquín del cantón Cuenca.

Se realizaron investigaciones etnomédicas para documentar los usos y aplicaciones terapéuticas de esta especie en la medicina tradicional.

Para el desarrollo de esta investigación se efectuó el análisis fitoquímico determinándose una serie de metabolitos entre los que se encontraron: taninos, compuestos fenólicos, triterpenos y/o esteroides, alcaloides, aminoácidos, leucoantocianidinas y flavonoides (a los cuales se cree que se debe el efecto antiinflamatorio).

En la tesis se usaron ratones machos Swiss albinos de aproximadamente 25 g de peso y como tratamiento tintura de Llantén al 30% en dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso, comparándose los resultados finales con el Blanco y con el patrón de Indometacina.

Se evaluó de forma cualitativa los parámetros de inflamación: calor, dolor, rubor, tumefacción y pérdida o disminución del funcionamiento (alteración del tejido afectado). Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de la inflamación de las diferentes dosis de la tintura de Llantén.

Mediante análisis estadístico posterior, se comprobó las propiedades antiinflamatorias de la tintura de Llantén obteniéndose los mejores resultados cuando se utilizó la dosis de 300 mg/kg.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN 14

INTRODUCCIÓN 15

OBJETIVOS 16

HIPÓTESIS 16

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……17

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS……..34

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN……...59

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……..83

BIBLIOGRAFÍA ..... …109

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LAS SUSTANCIAS CONTENIDAS EN LAS HOJAS DE LLANTÉN *(Plantago major L)* A TRAVÉS DE LA TÉCNICA DE INDUCCIÓN DE GRANULOMA POR ALGODÓN

Tesis de Grado previa a la Obtención del Título de Bioquímica

AUTORAS:

DIANA PATRICIA CARPIO PLAZA

LOURDES ELIZABETH RAMÓN MORA

DIRECTOR: Dr. FAUSTO ZARUMA TORRES

COODIRECTORA: Dra. ADELINA ASTUDILLO

CUENCA – ECUADOR

2009

AGRADECIMIENTO

Al terminar nuestra carrera universitaria queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento primero a Dios por enseñarnos el camino correcto de la vida guiándonos y fortaleciéndonos cada día con su Espíritu Santo.

A todas las personas que colaboraron desinteresadamente para el desarrollo de nuestra tesis, entre ellos:

Dr. Fausto Zaruma nuestro director de tesis por sus acertados conocimientos y apoyo brindado.

Dra. Adelina Astudillo por su valiosa ayuda durante la realización de nuestra tesis.

A los doctores Jaime Ulloa y Carmen Lucía López por su gran cooperación, sin la cual no hubiera sido posible culminarla satisfactoriamente.

Finalmente a todas aquellas personas que de manera sincera nos brindaron generosamente su valioso tiempo, paciencia y ayuda, a Don Jorge, Don Simón y Don Gerardo muchas gracias por todo.

DEDICATORIA

Al cerrarse otro ciclo más en mi vida quiero dedicar este trabajo primero a Dios por brindarme la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

A mi padre Rogelio quien desde el cielo ha guiado mis pasos, cuidándome todo el tiempo.

A mi madre Patricia, la razón de mi vida, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado ahí apoyándome y brindándome todo su amor.

A mis queridas hermanas Paola y Cristina por la paciencia y palabras de aliento brindadas.

A mis abuelitos Juan y Julia que han sido como mis segundos padres por todo el cariño y amor que me brindaron desde el momento que nací.

Finalmente a todos y cada uno de los miembros de mi familia quienes de una u otra manera colaboraron para la culminación de mis estudios.

Diana Carpio P.

DEDICATORIA

Al terminar mi vida universitaria, quiero dedicar en primer lugar esta tesis a Dios, por ser Él la luz que guía mi camino, dándome la vida y la fortaleza para seguir adelante a pesar de las dificultades.

A mis adorados padres: Gilberto y Dora por ser mi apoyo e impulso para crecer día a día como persona y futuramente como profesional.

A mis queridos hermanos: Karina, Byron, Luz María, Tania y Maribel por haber creído en mí e igualmente brindarme su apoyo para culminar mis estudios.

A mi familia, en especial a mis abuelitos Luis y Luz, quienes ya no están conmigo pero sé que en cualquier lugar donde se encuentren ellos me están apoyando y se encuentran orgullosos de mí.

Lourdes Ramón M.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

Pág.

AGRADECIMIENTO..... 1

DEDICATORIA..... 2

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN 14

INTRODUCCIÓN 15

OBJETIVOS 16

HIPÓTESIS 16

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. 1. GENERALIDADES 17

1.1.1. BREVE HISTORIA DE LA INFLAMACIÓN..... 17

1.1.2. DEFINICIÓN DE INFLAMACIÓN 19

1.1.3. CAUSAS DE INFLAMACIÓN 20

1.1.4. REACCIONES BÁSICAS DE LA INFLAMACIÓN..... 20

1.1.5. ACTORES DEL PROCESO INFLAMATORIO 21

1.1.5.1. CÉLULAS 21

1.1.5.2. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN..... 22

1.1.5.2.1. MEDIADORES DE ORIGEN PLASMÁTICO 22

1.1.5.2.2. MEDIADORES DERIVADOS DE CÉLULAS 23

1.1.5.2.2.1. MEDIADORES CELULARES SINTETIZADOS 23

1.1.6. MECANISMO GENERAL DE INFLAMACIÓN 24

1.1.7. TIPOS DE INFLAMACIÓN 25

1.2. ANTIINFLAMATORIOS 26

1.2.1.TIPOS DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES) 26

1.2.1.1. ACCIONES FARMACOLÓGICAS 27

1.2.2. FÁRMACO PATRÓN EMPLEADO EN EL ENSAYO - INDOMETACINA 27

1.2.2.1. FARMACODINAMIA..... 28

1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA, CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LA PLANTA UTILIZADA EN EL ESTUDIO..... 29

1.3.1. Etimología 29

1.3.2. Origen 29

1.3.3. Descripción taxonómica 29

1.3.4. Ubicación geográfica 30

1.3.5. Composición química 30

1.3.6. Parte de la planta usada en medicina tradicional 31

1.3.7. Formas de uso recomendadas 31

1.3.8. Uso en medicina tradicional 31

1.3.9. Otras aplicaciones en la medicina 32

1.3.10. Posología 32

1.3.11. Propiedades del llantén 32

1.4. PLANTAS CON EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS SIMILARES AL *Plantago major L* 32

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS 34

2.1.1. RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL 34

2.1.2. SECADO 35

2.1.3. PULVERIZADO Y TAMIZADO 35

2.1.4. ALMACENAMIENTO 35

2.1.5. ENSAYOS MACROMORFOLÓGICOS..... 36

2.1.6. ENSAYOS MICROMORFOLÓGICOS 36

2.1.7. PRUEBAS HISTOQUÍMICAS 37

2.1.7.1. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS DE ALMIDÓN 37

2.1.7.2. DETERMINACIÓN DE LIGNINA 37

2.1.7.3. DETERMINACIÓN DE TRICOMAS EPIDÉRMICOS..... 37

2.1.7.4. DETERMINACIÓN DE CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO 38

2.1.7.5. DETERMINACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO..... 38

2.1.7.6. DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES..... 38

2.1.8. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS..... 38

2.1.8.1. DETERMINACIÓN DE HOJAS ENNEGRECIDAS 39

2.1.8.2. DETERMINACIÓN DE PARTES DE LA PROPIA PLANTA 39

2.1.8.3. DETERMINACIÓN DE MATERIAS EXTRAÑAS 40

2.1.8.3.1. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EXTRAÑA 40

2.1.8.3.2. DETERMINACIÓN DE MATERIA INORGÁNICA EXTRAÑA 40

2.1.8.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD 41

2.1.8.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES..... 42

2.1.8.6. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES..... 43

2.1.9. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS 44

2.1.10. ESTUDIO FITOQUÍMICO 46

2.1.10.1. ENSAYOS SOBRE LAS FRACCIONES A-E 46

2.1.10.1.1. AMINOÁCIDOS - ENSAYO DE NINHIDRINA... 45

2.1.10.1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS - ENSAYO DE $FeCl_3$..... 46

2.1.10.1.3. FLAVONOIDES - ENSAYO DE SHINODA 47

2.1.10.1.4. LEUCOANTOCIANIDINAS - ENSAYO DE ROSENHEIM 47

2.1.10.1.5. TANINOS - ENSAYO DE GELATINA-SAL 47

2.1.10.1.6. QUINONAS-ENSAYO DE BORNGTRAGER.... 48

2.1.10.1.7. TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES - ENSAYO DE LIEBERMAN-BURCHARD..... 48

2.1.10.1.8. CARDIOTÓNICOS - ENSAYO DE KEDDE 48

2.1.10.1.9. ENSAYOS PARA ALCALOIDES 49

2.1.10.2. REACCIONES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS METABOLITOS..... 49

2.1.10.2.1. ENSAYOS PARA EL RECONOCIMIENTO DE GLÚCIDOS 49

2.1.11. PREPARACIÓN DE LA TINTURA DE LLANTÉN AL 30%..... 51

2.1.12. ACTIVIDADES REALIZADAS PREVIO AL ANÁLISIS FARMACOLÓGICO 52

2.1.12.1. VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN 52

2.1.12.2. PRÁCTICA DE LA TÉCNICA 52

2.1.13. ANÁLISIS FARMACOLÓGICO 53

2.1.13.1. MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACIÓN: GRANULOMA INDUCIDO POR DISCO DE ALGODÓN..... 53

2.1.13.1.1. PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN 55

2.1.13.2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO 56

2.1.13.2.1. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CUALITATIVO .. 57

2.1.13.2.2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CUANTITATIVO 58

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MACROMORFOLÓGICO 59

3.1.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROMORFOLÓGICO..... 60

3.1.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS HISTOQUÍMICAS 60

3.1.4. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS 61

3.1.4.1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS..... 61

3.1.4.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS 62

3.1.5. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS……..62

3.1.6. RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA 63

3.1.7. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS METABOLITOS 64

3.1.7.1.RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE GLÚCIDOS 64

3.1.8. RESULTADO DE LA VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN..... 64

3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 65

3.2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO 65

3.2.1.1. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN..... 65

3.2.1.2. ANÁLISIS DE PROPORCIONES 70

3.2.1.2.1. TABLAS DEL ANÁLISIS DE PROPORCIONES 71

3.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO..... 72

3.2.2.2. PRUEBA T DE STUDENT..... 80

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES..... 83

4.2. RECOMENDACIONES 85

BIBLIOGRAFÍA 109

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1.- Agentes causales de la inflamación: Modificada de Gabay 20

TABLA 1.2.- Clasificación-Grupo Fármacos Antiinflamatorios: Modificada de Farmacología de la inflamación y el dolor 27

TABLA 2.1.- Límites de contaminación microbiana para drogas de uso interno: Modificada por B. Frank 44

TABLA 2.2.- Peso individual de los ratones por lotes..... 53

TABLA 3.1.- Resultado del análisis macromorfológico de la droga..... 58

TABLA 3.2.- Resultados de pruebas histoquímicas 59

TABLA 3.3.- Límites máximos establecidos para los parámetros físico-químicos de la droga *Plantago Lanceolata L*..... 60

TABLA 3.4.- Resultados del análisis físico de la droga de PmL..... 60

TABLA 3.5.- Resultados del análisis químico de la droga de PmL..... 61

TABLA 3.6.- Resultados del análisis microbiológico..... 61

TABLA 3.7.- Leyenda de interpretación de los resultados de la marcha fitoquímica..... 62

TABLA 3.8.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción A..... 62

TABLA 3.9.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción B..... 63

TABLA 3.10.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción E... 63

TABLA 3.11.- Resultados de la determinación de glúcidos 63

TABLA 3.12.- Dolor intenso en los ratones tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, comparado con el Blanco y con el Patrón de Indometacina 64

TABLA 3.13.- Tumefacción intensa en los ratones tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, comparada con el Blanco y con el Patrón de Indometacina 67

TABLA 3.14.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Rubor Epidérmico 69

TABLA 3.15.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Calor Local 70

TABLA 3.16.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Dolor Local 70

TABLA 3.17.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Tumefacción Local 70

TABLA 3.18.- Resultados de los contenidos acuoso y fibrogranuloso de los ratones 72

TABLA 3.19.- Contenido acuoso de las dosis de PmL frente al Blanco y al patrón de Indometacina 74

TABLA 3.20.- Contenido Fibrogranuloso de las dosis de PmL frente al Blanco y al patrón de Indometacina 75

TABLA 3.21.- Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco y a la Indometacina 76

TABLA 3.22.- Contenido acuoso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco y a la Indometacina 76

TABLA 3.23.- Contenido Fibrogranuloso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco 78

TABLA 3.24.- Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al patrón de Indometacina..... 79

TABLA 3.25.- Contenido Acuoso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Patrón de Indometacina 79

TABLA 3.26.- Contenido Fibrogranuloso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Patrón de Indometacina 81

TABLA 3.27.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al Blanco - Contenido Acuoso 83

TABLA 3.28.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al Blanco - Contenido Fibrogranuloso 83

TABLA 3.29- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al patrón de Indometacina - Contenido Acuoso 84

TABLA 3.30.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al patrón de Indometacina – Contenido Fibrogranuloso..... 85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1.- Inflamación 19

FIGURA 1.2.- Estructura química de la Indometacina 27

FIGURA 1.3.- *Plantago major L* 29

FIGURA 3.1.- Análisis macromorfológico de la droga de PmL..... 58

FIGURA 3.2.- Corte de la hoja de PmL..... 59

FIGURA 3.3.- Histograma del parámetro dolor intenso de las dosis de PmL frente al blanco y al Patrón de Indometacina 65

FIGURA 3.4.- Histograma del porcentaje de ratones dolor intenso basado en la observación diaria del tratamiento con PmL, Blanco e Indometacina 66

1. 1. GENERALIDADES 17

1.1.1. BREVE HISTORIA DE LA INFLAMACIÓN..... 17

1.1.2. DEFINICIÓN DE INFLAMACIÓN 19

1.1.3. CAUSAS DE INFLAMACIÓN 20

1.1.4. REACCIONES BÁSICAS DE LA INFLAMACIÓN..... 20

1.1.5. ACTORES DEL PROCESO INFLAMATORIO 21

1.1.5.1. CÉLULAS 21

1.1.5.2. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN..... 22

1.1.5.2.1. MEDIADORES DE ORIGEN PLASMÁTICO 22

1.1.5.2.2. MEDIADORES DERIVADOS DE CÉLULAS 23

1.1.5.2.2.1. MEDIADORES CELULARES SINTETIZADOS 23

1.1.6. MECANISMO GENERAL DE INFLAMACIÓN 24

1.1.7. TIPOS DE INFLAMACIÓN 25

1.2. ANTIINFLAMATORIOS 26

1.2.1.TIPOS DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES) 26

1.2.1.1. ACCIONES FARMACOLÓGICAS 27

1.2.2. FÁRMACO PATRÓN EMPLEADO EN EL ENSAYO - INDOMETACINA 27

1.2.2.1. FARMACODINAMIA..... 28

1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA, CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LA PLANTA UTILIZADA EN EL ESTUDIO..... 29

1.3.1. Etimología 29

1.3.2. Origen 29

1.3.3. Descripción taxonómica 29

1.3.4. Ubicación geográfica 30

1.3.5. Composición química 30

1.3.6. Parte de la planta usada en medicina tradicional 31

1.3.7. Formas de uso recomendadas 31

1.3.8. Uso en medicina tradicional 31

1.3.9. Otras aplicaciones en la medicina 32

1.3.10. Posología 32

1.3.11. Propiedades del llantén 32

1.4. PLANTAS CON EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS SIMILARES AL *Plantago major L* 32

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS 34

2.1.1. RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL 34

2.1.2. SECADO 35

2.1.3. PULVERIZADO Y TAMIZADO 35

2.1.4. ALMACENAMIENTO 35

2.1.5. ENSAYOS MACROMORFOLÓGICOS..... 36

2.1.6. ENSAYOS MICROMORFOLÓGICOS 36

2.1.7. PRUEBAS HISTOQUÍMICAS 37

2.1.7.1. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS DE ALMIDÓN 37

2.1.7.2. DETERMINACIÓN DE LIGNINA 37

2.1.7.3. DETERMINACIÓN DE TRICOMAS EPIDÉRMICOS..... 37

2.1.7.4. DETERMINACIÓN DE CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO 38

2.1.7.5. DETERMINACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO..... 38

2.1.7.6. DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES..... 38

2.1.8. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS..... 38

2.1.8.1. DETERMINACIÓN DE HOJAS ENNEGRECIDAS 39

2.1.8.2. DETERMINACIÓN DE PARTES DE LA PROPIA PLANTA 39

2.1.8.3. DETERMINACIÓN DE MATERIAS EXTRAÑAS 40

2.1.8.3.1. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EXTRAÑA 40

2.1.8.3.2. DETERMINACIÓN DE MATERIA INORGÁNICA EXTRAÑA 40

2.1.8.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD 41

2.1.8.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES..... 42

2.1.8.6. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES..... 43

2.1.9. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS 44

2.1.10. ESTUDIO FITOQUÍMICO 46

2.1.10.1. ENSAYOS SOBRE LAS FRACCIONES A-E 46

2.1.10.1.1. AMINOÁCIDOS - ENSAYO DE NINHIDRINA... 45

2.1.10.1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS - ENSAYO DE $FeCl_3$..... 46

2.1.10.1.3. FLAVONOIDES - ENSAYO DE SHINODA 47

2.1.10.1.4. LEUCOANTOCIANIDINAS - ENSAYO DE ROSENHEIM 47

2.1.10.1.5. TANINOS - ENSAYO DE GELATINA-SAL 47

2.1.10.1.6. QUINONAS-ENSAYO DE BORNGTRAGER.... 48

2.1.10.1.7. TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES - ENSAYO DE LIEBERMAN-BURCHARD..... 48

2.1.10.1.8. CARDIOTÓNICOS - ENSAYO DE KEDDE 48

2.1.10.1.9. ENSAYOS PARA ALCALOIDES 49

2.1.10.2. REACCIONES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS METABOLITOS..... 49

2.1.10.2.1. ENSAYOS PARA EL RECONOCIMIENTO DE GLÚCIDOS 49

2.1.11. PREPARACIÓN DE LA TINTURA DE LLANTÉN AL 30%..... 51

2.1.12. ACTIVIDADES REALIZADAS PREVIO AL ANÁLISIS FARMACOLÓGICO 52

2.1.12.1. VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN 52

2.1.12.2. PRÁCTICA DE LA TÉCNICA 52

2.1.13. ANÁLISIS FARMACOLÓGICO 53

2.1.13.1. MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACIÓN: GRANULOMA INDUCIDO POR DISCO DE ALGODÓN 53

2.1.13.1.1. PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN 55

2.1.13.2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO 56

2.1.13.2.1. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CUALITATIVO .. 57

2.1.13.2.2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CUANTITATIVO 58

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MACROMORFOLÓGICO 59

3.1.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROMORFOLÓGICO..... 60

3.1.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS HISTOQUÍMICAS 60

3.1.4. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS 61

3.1.4.1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS 61

3.1.4.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS 62

3.1.5. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS……..62

3.1.6. RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA 63

3.1.7. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS METABOLITOS 64

3.1.7.1.RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE GLÚCIDOS 64

3.1.8. RESULTADO DE LA VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN 64

3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 65

3.2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO 65

3.2.1.1. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN 65

3.2.1.2. ANÁLISIS DE PROPORCIONES 70

3.2.1.2.1. TABLAS DEL ANÁLISIS DE PROPORCIONES 71

3.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO..... 72

3.2.2.2. PRUEBA T DE STUDENT..... 80

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES..... 83

4.2. RECOMENDACIONES 85

BIBLIOGRAFÍA 109

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1.- Agentes causales de la inflamación: Modificada de Gabay 20

TABLA 1.2.- Clasificación-Grupo Fármacos Antiinflamatorios: Modificada de Farmacología de la inflamación y el dolor 27

TABLA 2.1.- Límites de contaminación microbiana para drogas de uso interno: Modificada por B. Frank 44

TABLA 2.2.- Peso individual de los ratones por lotes..... 53

TABLA 3.1.- Resultado del análisis macromorfológico de la droga 58

TABLA 3.2.- Resultados de pruebas histoquímicas 59

TABLA 3.3.- Límites máximos establecidos para los parámetros físico-químicos de la droga *Plantago Lanceolata L*..... 60

TABLA 3.4.- Resultados del análisis físico de la droga de PmL 60

TABLA 3.5.- Resultados del análisis químico de la droga de PmL..... 61

TABLA 3.6.- Resultados del análisis microbiológico..... 61

TABLA 3.7.- Leyenda de interpretación de los resultados de la marcha fitoquímica..... 62

TABLA 3.8.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción A..... 62

TABLA 3.9.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción B..... 63

TABLA 3.10.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción E... 63

TABLA 3.11.- Resultados de la determinación de glúcidos 63

TABLA 3.12.- Dolor intenso en los ratones tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, comparado con el Blanco y con el Patrón de Indometacina 64

TABLA 3.13.- Tumefacción intensa en los ratones tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, comparada con el Blanco y con el Patrón de Indometacina 67

TABLA 3.14.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Rubor Epidérmico 69

TABLA 3.15.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Calor Local 70

TABLA 3.16.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Dolor Local 70

TABLA 3.17.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Tumefacción Local 70

TABLA 3.18.- Resultados de los contenidos acuoso y fibrogranuloso de los ratones 72

TABLA 3.19.- Contenido acuoso de las dosis de PmL frente al Blanco y al patrón de Indometacina 74

TABLA 3.20.- Contenido Fibrogranuloso de las dosis de PmL frente al Blanco y al patrón de Indometacina 75

TABLA 3.21.- Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco y a la Indometacina 76

TABLA 3.22.- Contenido acuoso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco y a la Indometacina 76

TABLA 3.23.- Contenido Fibrogranuloso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco 78

TABLA 3.24.- Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al patrón de Indometacina..... 79

TABLA 3.25.- Contenido Acuoso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Patrón de Indometacina 79

TABLA 3.26.- Contenido Fibrogranuloso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Patrón de Indometacina 81

TABLA 3.27.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al Blanco - Contenido Acuoso 83

TABLA 3.28.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al Blanco - Contenido Fibrogranuloso 83

TABLA 3.29- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al patrón de Indometacina - Contenido Acuoso 84

TABLA 3.30.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al patrón de Indometacina – Contenido Fibrogranuloso..... 85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1.- Inflamación 19

FIGURA 1.2.- Estructura química de la Indometacina 27

FIGURA 1.3.- *Plantago major L* 29

FIGURA 3.1.- Análisis macromorfológico de la droga de PmL..... 58

FIGURA 3.2.- Corte de la hoja de PmL..... 59

FIGURA 3.3.- Histograma del parámetro dolor intenso de las dosis de PmL frente al blanco y al Patrón de Indometacina 65

FIGURA 3.4.- Histograma del porcentaje de ratones dolor intenso basado en la observación diaria del tratamiento con PmL, Blanco e Indometacina 66

FIGURA 3.5.- Histograma del parámetro tumefacción intensa de las dosis de PmL frente al blanco y al Patrón de Indometacina..... 67

FIGURA 3.6.- Histograma del porcentaje de ratones con tumefacción intensa basado en la observación diaria del tratamiento con PmL, Blanco e Indometacina..... 68

FIGURA 3.7.- Histograma del Contenido Acuoso frente al Blanco y al patrón de Indometacina..... 74

FIGURA 3.8.- Histograma del Contenido Fibrogranuloso frente al Blanco y al patrón de Indometacina..... 75

FIGURA 3.9- Histograma de Inhibición de la Inflamación del Contenido Acuoso con las dosis de PmL frente al Blanco y al Patrón 77

FIGURA 3.10.- Histograma de Inhibición de la Inflamación del Contenido Fibrogranuloso con las dosis de PmL frente al Blanco y al Patrón..... 78

FIGURA 3.11.- Histograma del porcentaje de Inhibición de la Inflamación del Contenido Acuoso frente al Patrón de Indometacina 80

FIGURA 3.12.- Histograma del porcentaje de Inhibición de la Inflamación del Contenido Fibrogranuloso frente al Patrón de Indometacina 81

INTRODUCCIÓN

En muchos sistemas de salud del mundo, es frecuente el uso de drogas vegetales como parte integral de la medicina convencional, hecho que ha favorecido a la medicina científica para validar la acción terapéutica y establecer los usos correctos de los recursos vegetales. (1)

La medicina alternativa constituye una valiosa contribución en la solución de los problemas de la salud pública, mismos que resultan tan críticos como la falta de medicamentos, además de sus altos precios, en el mercado nacional e internacional que los vuelve inalcanzables para aquellas personas de escasos recursos económicos, incluyendo la gran variedad de reacciones adversas e interacciones medicamentosas.(1)

En la actualidad se realizan una serie de estudios para evaluar los efectos de diferentes plantas medicinales de acuerdo al uso popular que se les atribuye; se realizan investigaciones acerca de los principios activos

responsables de una determinada acción farmacológica y los metabolitos secundarios que presentan. (2)

Hoy por hoy proliferan diferentes formas medicamentosas como cápsulas o tabletas preparados a partir de especies vegetales que se utilizan en la medicina tradicional, pero para poder lograr credibilidad en este tipo de medicina es necesario conocer la identidad de la especie vegetal pues la fuerte demanda conlleva a la adulteración de las plantas medicinales, es por esto que se vuelve muy necesario desarrollar procesos de identificación rápidos y seguros que permitan evaluar la cantidad de principios activos presentes en un determinado extracto con actividad farmacológica.(2)

En cuanto a nuestro país la medicina tradicional es utilizada ampliamente y desde tiempos ancestrales. El conocimiento sobre salud, enfermedad, prevención y tratamiento ha sido transmitido de una generación a otra a través del tiempo. (3)

En el Ecuador se cuenta con un sinnúmero de plantas medicinales que aún no han sido debidamente estudiadas, sin embargo fueron utilizadas por nuestros antepasados

con fines curativos, logrando buenos resultados en el campo de la medicina.(3)

Las especies del género *Plantago* son de uso frecuente en la sierra de nuestro país, siendo sus propiedades medicinales muy variadas, llamando la atención su actividad antiinflamatoria; lo cual motivó a valorar dicha propiedad medicinal en la especie PmL mediante la técnica del linfogranuloma de algodón (LGA).

OBJETIVOS

GENERAL:

- Determinar el efecto antiinflamatorio de las sustancias contenidas en las hojas de Llantén (*Plantago major L)* mediante la técnica del linfogranuloma de algodón.

ESPECÍFICO:

- Comprobar el efecto antiinflamatorio de la tintura de Llantén.
- Comparar el efecto frente al patrón (Indometacina) con la técnica de linfogranuloma de algodón utilizando tintura al 30% a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg.

HIPÓTESIS

La tintura de *Plantago major L*. al 30% posee principios activos que presentan propiedades antiinflamatorias semejantes al patrón de Indometacina, medido a través de la técnica del LGA.

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INFLAMACIÓN

1.1. GENERALIDADES

La evolución de las especies debió incorporar en algún momento a los mecanismos defensivos inespecíficos la posibilidad de responder con inflamación frente al daño de algún tejido, lo cual queda de manifiesto al analizar los objetivos de la respuesta inflamatoria, entre ellos destacan:

destruir al agente invasor, limitar el tamaño de la lesión, impedir la diseminación del agente agresor y finalmente reparar el daño tisular. (4)

Esta respuesta inflamatoria representa, la participación de numerosas sustancias biológicas, la mayoría producidas por el propio organismo, así como la participación de numerosos actores celulares, los cuales en condiciones normales actúan de manera controlada. (4)

Por lo general este proceso concluye sin mayores novedades, pero si la respuesta inflamatoria es insuficiente se corre el riesgo de que se desarrolle una respuesta sistémica, la que eventualmente si no es tratada a tiempo puede llevar a serias consecuencias como la falla progresiva de órganos y sistemas.(4)

1.1.1. BREVE HISTORIA DE LA INFLAMACIÓN

Desde hace mucho tiempo la inflamación ha permitido la supervivencia de los organismos y de las especies, sin duda la respuesta inflamatoria está fuertemente relacionada con el trauma y la infección. (4)

En Grecia y en Roma existen escritos de Hipócrates y Celso, que identificaban 3 o 4 signos cardinales de la inflamación. Posteriormente Virchow identificó el quinto signo.(4)

Actualmente se pueden reconocer sus 5 signos cardinales, que son:

- **Tumefacción:** Consiste en el aumento de tamaño de la región o el órgano inflamado y es la consecuencia de la acumulación de sangre y de exudado en el foco inflamatorio.(5)
- **Rubor:** Corresponde al color rojo de la zona inflamada y se debe a la acumulación de sangre.(5)
- **Calor:** Aumento de la temperatura de la zona inflamada debido a un mayor flujo sanguíneo en el área traumática, y esto se debe a la vasodilatación y al incremento del consumo local de oxigeno. (4)
- **Dolor:** Los mediadores químicos aumentan la permeabilidad capilar con lo que los líquidos y las células sanguíneas pasan al espacio extravascular

provocando la hinchazón y un aumento de la presión local que es lo que origina el dolor. (4)

- **Pérdida o disminución de la función:** Llamado quinto signo de Virchow que consiste en la alteración del órgano o tejido afectado. (4)

En 1973 el cirujano escocés Hunter destacó algo que en la actualidad es considerado un hecho "*La inflamación no es una enfermedad, sino una respuesta inespecífica que produce un efecto saludable en el organismo en que tiene lugar".*(4)

Sir Thomas Lewis mediante experimentos sencillos sobre la respuesta inflamatoria de la piel, estableció el concepto de que diversas sustancias químicas inducidas localmente por el estímulo de una lesión, como la histamina, son factores mediadores de las alteraciones vasculares de la inflamación. Este concepto resultó de vital importancia para el descubrimiento de los mediadores químicos de la inflamación y la posibilidad de utilizar fármacos antiinflamatorios. (4)

Lewis llamó a los mediadores químicos de la inflamación "H2" y definió la triple respuesta vascular responsable de

los cambios alrededor de la zona dañada misma que consistía en:

- Eritema central
- Hinchazón
- Eritema periférico. (4)

1.1.2. DEFINICIÓN DE INFLAMACIÓN

"Es el conjunto de respuestas de los tejidos vivos frente a una agresión física, infecciosa o autoinmune, que determina en los sistemas homeostáticos de la sangre y en el tejido conectivo, una serie de cambios encaminados a localizar y aislar el agente agresor para luego eliminarlo y reparar el daño tisular ".(6)

El mayor problema que surge en la inflamación es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos. (4)

La reacción vascular es el componente más importante de la inflamación, permite la afluencia a la zona afectada de moléculas y células, encargadas de neutralizar y retirar los agentes agresores y los restos del tejido dañado.(4) A

continuación se muestran las reacciones desencadenadas en el organismo:

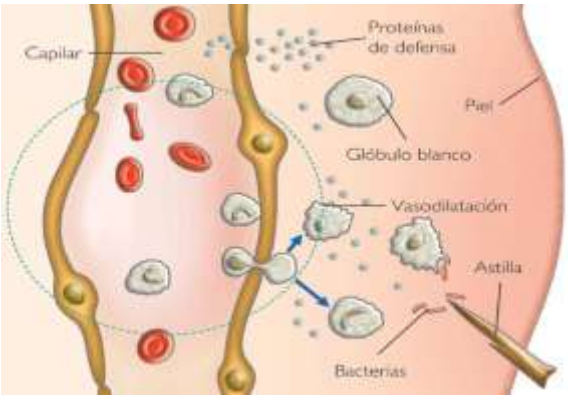


Figura 1.1. Inflamación: La inflamación empieza con la vasodilatación, esto provoca enrojecimiento, aumento de la temperatura de la zona e hinchazón. En la zona inflamada se liberan sustancias que irritan las terminaciones nerviosas causando dolor y en algunos casos otras que originan fiebre. El aumento de la temperatura favorece la respuesta inmunitaria. (7)

El objetivo final de la respuesta inflamatoria es en definitiva la reparación del daño sufrido por el organismo, mediante la proliferación de células especificas o bien su sustitución por fibroblastos dejando en este caso como secuela una cicatriz. (4).

1.1.3. CAUSAS DE LA INFLAMACIÓN

La inflamación es causada por la liberación de sustancias llamadas prostaglandinas (PGs), que se hallan almacenadas en todas las células del cuerpo. Cuando un factor agresivo ataca al cuerpo, las PGs se liberan como medio de defensa y se presenta hinchazón, enrojecimiento y dolor de la parte afectada. (4)

Los agentes causantes de la inflamación son muy variados algunos de ellos se muestran en la Tabla 1.1.

Agentes causales de la Inflamación

Agentes Causales	Ejemplos
Agentes físicos	Traumatismos, quemaduras, electricidad, calor, etc
Agentes químicos	Cáusticos
Agentes biológicos	Bacterias, virus, parásitos, hongos, etc
Agentes endógenos	Oxidantes, isquemia, activación de mediadores químicos, etc.
Cuerpos extraños	Hilos de sutura, sílice,

	cristales de uratos.

TABLA 1.1.- Modificada de Gabay y Colaboradores.(4)

1.1.4. REACCIONES BÁSICAS DE LA INFLAMACIÓN

La aparición de una inflamación precisa de una serie de mecanismos. Cada uno condiciona una alteración morfológica, que define el momento e intensidad del desarrollo de la inflamación, actúa independientemente y no es específico de la inflamación. (8)

Los fenómenos morfológicos básicos de la inflamación son los siguientes:

1. **Lesión del tejido:** La lesión inicial del tejido depende de la causa de la inflamación y es el desencadenante inicial de la reacción.(8)
2. **Reacción vascular:** La reacción vascular consiste en una vasodilatación arteriolar, a veces precedida de una vasoconstricción transitoria. En este proceso se produce la apertura de esfínteres capilares y la dilatación de capilares y vénulas, con lo que

aumenta varias veces el flujo sanguíneo y la velocidad de la sangre en el foco inflamatorio.(8)

1.1.5. ACTORES DEL PROCESO INFLAMATORIO

Aquí participan:

- Células.
- Vasos sanguíneos y linfáticos.
- Mediadores químicos.
- Matriz extracelular.

Las células inflamatorias son activadas amplificando la inflamación y siendo modulada por diferentes mediadores.(4)

1.1.5.1. CÉLULAS

Las principales células que participan en el proceso inflamatorio son:

Células provenientes de la sangre:

- Leucocitos polimorfonucleares - granulocitos.
  - Polimorfonucleares neutrófilos (PMN)
  - Eosinófilos (Eos)
  - Basófilos (Bas)

- Monocitos (Mon) - macrófagos (MØs)
- Linfocitos (Ls)

Células provenientes del tejido conectivo:

- Mastocitos (Mas) o células cebadas

Otras células:

- Fibroblasto, endotelio, etc (4)

Los fagocitos más eficientes son los PMN y los MØs.
De todos los actores celulares los Mas son quizá los más importantes porque actúan en las etapas iniciales de la inflamación conjuntamente con las plaquetas y los Bas, liberando mediadores vasoactivos.(4)

1.1.5.2. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

Una de las fases claves del proceso inflamatorio la constituye el conjunto de eventos bioquímicos que conducen a la secreción - liberación de unas sustancias biológicamente activas, denominadas mediadores químicos de la inflamación, que son responsables de los cambios metabólicos, vasculares y celulares que caracterizan propiamente a la inflamación. (4)

Los mediadores químicos tienen acción directa sobre las células y los vasos sanguíneos.

Presentan las siguientes características:

- Los mediadores pueden ser de origen plasmático o celular.
- Un mediador químico puede estimular la liberación de otros mediadores químicos en las células en las cuales actúan.
- Los mediadores pueden actuar sobre distintos tipos celulares y producir distintas actividades biológicas.
- La mayoría de los mediadores duran muy poco en la circulación sanguínea y ejercen su efecto a través de receptores.(4)

1.1.5.2.1. MEDIADORES DE ORIGEN PLASMÁTICO

Este tipo de mediadores están presentes en el plasma en forma de precursores que deben ser activados, pertenecen a sistemas de proteínas que interactúan entre si y son:

- Sistema de la coagulación
- Sistema de quininas plasmáticas
- Sistema del complemento

- Factor de Hageman o Factor XII (4)

El factor de Hageman puede ser activado por enzimas, endotoxinas, cristales de urato, colágeno y participan por numerosas vías en el proceso inflamatorio.(4)

1.1.5.2.2. MEDIADORES DERIVADOS DE CÉLULAS

Los mediadores producidos por las células se encuentran normalmente secuestrados en gránulos intracelulares mientras que otro grupo de mediadores son sintetizados al activarse sustancias como las PGs. (4)

1.1.5.2.2.1. MEDIADORES CELULARES SINTETIZADOS

Entre estos mediadores se encuentran aquellos derivados del ácido araquidónico, citoquinas y otros como el óxido nítrico. (4)

El metabolismo del acido araquidónico se produce a través de la activación de los Mos, Bas y plaquetas dando lugar a la síntesis de PGs, leucotrienos (LcTs) y tromboxanos (TX).(9)

- Prostaglandinas PGE2, PGI2, PGD2: Producen vasodilatación, fiebre y dolor.
- Leucotrienos LcTC4, LcTD2 y LcTE4: Producen vasoconstricción, aumento de la permeabilidad y broncoespasmo. El LcTB4: Promueve adherencia leucocitaria y quimiotaxis.
- Tromboxanos A2 (TXA2): Producen agregación plaquetaria y vasoconstricción.(10)

Para que se realice la síntesis de PGs y LcTs es preciso que el ácido araquidónico se encuentre libre, lo cual es posible mediante la acción de fosfolipasas. El ácido araquidónico libre puede sufrir la acción de la ciclooxigenasa (COX) también conocida como Protaglandina sintetasa, iniciando la biosíntesis de PGs.(4). A la fecha, se han descrito al menos dos isoformas de la COX, una denominada COX-1 o “constitutiva” y descrita como la responsable de la biosíntesis de PGs importantes en la homeostasis y ciertas funciones fisiológicas. Otra denominada COX-2 o “inducible”, que aparece en el escenario en respuesta a un daño tisular o estímulo inflamatorio y por lo tanto se ha propuesto que participa y/o empeora la respuesta inflamatoria. La identificación de

estas dos isoformas ha motivado el desarrollo de nuevos antiinflamatorios con mayor selectividad sobre la COX-2. (11). Por otra parte el ácido araquidónico, puede ser sustrato de diferentes lipooxigenasas, la más importante la 5-lipooxigenasa. Esta enzima aparece exclusivamente en neutrófilos (Nts), Mas, células cebadas y Eos, siendo, por tanto, éstas las únicas células capaces de producir LcTs, cuya función está estrechamente relacionada con la inflamación (4).

Por otro lado la función de las citoquinas como las interleuquinas (ILs) o el factor de necrosis tisular (TNF) se basa en promover la adherencia leucocitaria al endotelio, fomentar la síntesis de PGs y quimiotaxis.(4)

Mientras que el Óxido Nítrico producido en las neuronas, MØs y células endoteliales es un factor relajante de músculos liso (vasodilatación). (10)

1.1.6. MECANISMO GENERAL DE INFLAMACIÓN

La inflamación puede iniciarse por estímulos infecciosos, físicos, químicos, o traumáticos.

El proceso tiene tres fases: iniciación, consolidación y resolución.

La primera fase se origina por la acción de células como los PMN, Bas y Eos y de los factores producidos por ellos. Además participan las plaquetas. La segunda fase ocurre gracias a la participación de MØs y de Ls. La fase de resolución se cumple por la interacción entre MØs y fibroblastos y busca reparar los daños producidos por la agresión. (6)

Una vez iniciado el proceso con aflujo de PMN, y Ls tiene lugar un balance homeostático entre el reclutamiento de estas células, división in situ, migración y muerte. Por lo general la inflamación aguda termina en resolución por apoptosis de las células que participan y por fagocitosis y lisis del microorganismo responsable, cuando el proceso inflamatorio es de origen infeccioso. Si el antígeno (Ag) no es eliminado o fallan los mecanismos homeostáticos, el proceso se hace crónico y se acompaña de daño tisular; en este caso hay una retención in situ de las células inflamatorias. (6)

El proceso inflamatorio tiene además un componente local y otro sistémico. En el primero participan los sistemas del

complemento, de coagulación y de las quininas así como metabolitos del acido araquidónico y varias citoquinas con lo cual se genera vasodilatación local, trasudación de líquidos, formación de edema, aumento de la temperatura local y aflujo de células de la sangre hacia el tejido afectado. (6)

La respuesta sistémica por su parte se caracteriza por fiebre, leucocitosis, cambios en las concentraciones de metales pesados e incremento en una serie de proteínas especiales producidas por el hígado que se conocen como proteínas de la fase aguda de la inflamación. Simultáneamente se producen cambios endocrinos como: aumento en la producción de cortisol, glucagón, catecolaminas y hormonas tiroideas, incremento de la gluconeogénesis y del catabolismo proteico con un balance nitrogenado negativo. (6)

1.1.7. TIPOS DE INFLAMACIÓN

La inflamación según su duración se divide en aguda, subaguda y crónica.

a. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente Nts; presenta un intenso enrojecimiento, aumento de la temperatura, tumefacción, dolor y alteraciones funcionales.(4)

b. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y MØs con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo, el cual puede llevar a la formación de granulomas; en esta inflamación se presenta un aumento de temperatura, rubor no tan intenso, y dolor menos agudo.(4)

c. ***"La Inflamación subaguda*** *es una forma intermedia de imbricación de inflamación aguda y de inflamación crónica. Tiene sentido tanto temporal como morfológico, pero la utilización de este término es obsoleto. A veces se encuentra una inflamación aguda central y crónica periférica como en los abscesos. Cualquier tipo de inflamación puede sufrir brotes de*

reagudización o pasar a una fase de cronificación". (12)

La mayoría de los experimentos para evaluar la acción antiinflamatoria involucran el uso de **granulomas por cuerpos extraños** para producir una inflamación subaguda.

El granuloma constituye un ganglio linfático formado *in situ,* en el lugar en donde se encuentra un Ag que no ha podido ser eliminado por la respuesta inmune. En el granuloma hay un importante acúmulo de Møs y de Ls, especialmente CD4 localizados en el centro y rodeados de una corona de LsT tipo CD8. Crecen en su interior neovasos con epitelio cuboide, a través del cual se hace el tráfico de Ls. (6)

Los Ls al entrar al granuloma liberan las distintas linfoquinas que sostienen el proceso de inflamación en un intento del organismo para destruir o aislar el Ag agresor. En la formación de granulomas hay una fase inicial de respuesta de los Ls Th1 seguida de una Th2. Hay producción local de IL 13 que propicia el desarrollo de fibrosis al promover la formación de fibroblastos y la producción de colágeno.(6)

1.2. ANTIINFLAMATORIOS

Son un grupo de fármacos que actúan bloqueando la síntesis de PGs, tienen además efecto analgésico y antipirético. (13)

1.2.1. TIPOS DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES)

También son conocidos como fármacos analgésicos-antipiréticos, porque la mayoría tiene acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Los principales se presentan en la Tabla 1.2.

Clasificación-Grupo Fármacos.

Grupo	Fármacos
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico y derivados (AAS, diflunisal, salsalato)
Paraaminofenoles	Paracetamol y propacetamol
Pirazolonas	Dipirona (metamizol) y fenilbutazona.
Derivados Indol-acéticos	Indometacina, diclofenaco
Derivados del ácido propiónico	Naproxeno, ibuprofeno y ketorolaco
Oxicamos	Piroxicam y tenoxicam.

Derivados del ácido antranílico	Ácido mefenámico.

TABLA 1.2.- Modificada de Farmacología de la inflamación y el dolor: http://personal.telefonica.terra.es/web/jramonl77/pasatiempos/tema%2022.pdf. (14)

1.2.1.1. ACCIONES FARMACOLÓGICAS

1.2.1.1.1. Acción antiinflamatoria.

Los AINEs disminuyen los síntomas de la inflamación (dolor, calor, edema, enrojecimiento) con independencia de la causa que la produce. Este efecto no sólo se explica por la inhibición de la COX, sino que también inhiben una serie de procesos asociados a la membrana de células características del proceso inflamatorio (Nts, Møs y Ls). (13)

1.2.2. FÁRMACO PATRÓN EMPLEADO EN EL ENSAYO – INDOMETACINA

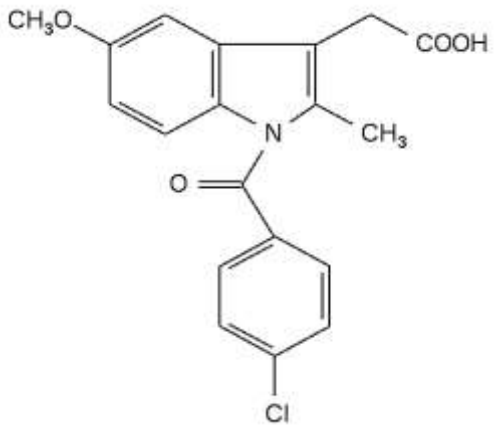


Figura 1.2.- Estructura química de la Indometacina: ácido 1-(p-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-acético (15)

La Indometacina fue introducida en 1963 para el tratamiento de la artritis reumatoidea y procesos inflamatorios relacionados, su eficacia es muy notable pero la incidencia elevada de efectos secundarios son intolerables a veces irreversibles y potencialmente mortales por lo que se ha limitado su uso. (13)

Sus acciones farmacológicas son poderosas, es uno de los más potentes inhibidores de las PGs, su acción analgésica independientemente de su acción antiinflamatoria se ejerce a niveles centrales y periféricos. (13)

Por vía oral se absorbe rápidamente y casi completa, se distribuye por todo el organismo inclusive llega al liquido sinovial donde alcanza concentraciones similares a las

plasmáticas en 5 horas, se une a proteínas plasmáticas en un 90% y tisulares.(13)

1.2.2.1. FARMACODINAMIA

Mecanismo de acción**:** La actividad de la Indometacina se logra por su capacidad para inhibir la COX, responsable de la síntesis de PGs. El efecto es más intenso sobre la COX-1 que sobre la COX-2, lo que explica sus efectos secundarios.(13)

La Indometacina previene la migración del ácido araquidónico hasta el centro activo de la COX, la inhibición se produce por la interacción electrostática entre el grupo carboxilato de la indometacina (cargado negativamente) y la Arg 120 (cargada positivamente) presente en el canal hidrofóbico donde se encuentra la COX, lo que supuestamente sirve para atraer al sustrato de ácido araquidónico durante la catálisis.(16)

1.2.2.1.1. Actividad antiinflamatoria

En muchos estudios experimentales, la Indometacina ha sido empleada como prototipo de agente no esteroideo

contra el cual se comparaban otros compuestos del mismo tipo. (17)

Su actividad antiinflamatoria fue demostrada por primera vez en animales, midiendo su capacidad para inhibir la formación de granuloma o el edema inducidos por la inyección subplantar de carragenina en ratas. Las pruebas comparativas de potencia indicaron que la Indometacina era más potente que el ácido acetilsalicílico, la fenilbutazona o la hidrocortisona. (18)

1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA, CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES DE LA PLANTA UTILIZADA EN EL ESTUDIO

Figura 1.3.- *Plantago major L* (19) – *Plantago major L* usado en el estudio

NOMBRE CIENTÍFICO: *Plantago major L.*

FAMILIA: Plantaginaceae.

NOMBRE COMÚN: Llantén mayor.

1.3.1. Etimología: El nombre del género plantago viene del latín planta, que significa pie y ago parecido, por la forma del pie que presentan las hojas de algunas especies.(20)

1.3.2. Origen: PmL es originaria de Europa y Asia. Crece en bordes de caminos, prados, solares abandonados, etc. Es de regiones cálidas y frías de todo el mundo y es considerada maleza.(20)

1.3.3. Descripción taxonómica: PmL es una hierba perenne que desarrolla su ciclo de vida entre seis y siete meses. Posee una altura entre 15 a 30 cm; sin embargo, su longitud puede variar según el distinto hábitat de crecimiento.(20)

El tallo de PmL es un rizoma corto de color amarillo. Por otro lado, las raíces son blancas y de tamaño uniforme, surgen del tallo subterráneo. (21)

Las hojas son ovaladas, de color verde claro y se unen al tallo por un largo pecíolo; poseen aproximadamente 50 cm de longitud y un ancho de 20 cm en plantas adultas. Nacen a ras de suelo en forma de roseta y se desarrollan verticalmente. Presentan un margen liso o denticulado, además de una nerviación paralela con tres u ocho venas. Los pecíolos son lisos y miden alrededor de 15 cm.(21)

La floración ocurre entre mayo y octubre, en zonas templadas. Presenta una inflorescencia tipo espiga, cuya mitad superior se recubre de pequeñas flores, estas poseen una coloración café-verdosa; su corola es amarilla y muy pequeña (unos 3mm de diámetro); por otra parte, las anteras son de color lila, al inicio, y luego se vuelven amarillentas. Los pedúnculos florales nacen del mismo punto de donde arrancan los pecíolos, y son de mayor longitud.(21)

El fruto es una pequeña cápsula que, cuando madura, se abre transversalmente dejando caer las semillas que contiene, éstas tienen forma ovalada, tamaño muy reducido y un ligero sabor amargo; se localizan de 8 á 16 semillas por cápsula. Con el clima húmedo, las

semillas se vuelven pegajosas, lo que provoca que se adhieran a los animales y de esta manera logran dispersarse.(21)

1.3.4. Ubicación geográfica: PmL se encuentra distribuida en casi toda Europa, África Norte, América Latina. Es una planta muy común y fácil de hallar en zonas de pastos, laderas, cerca de cultivos y en los bordes de caminos.(21). Debido a su origen en zonas templadas, crece muy bien en hábitats intervenidos de la región interandina o Sierra Ecuatoriana.(3)

1.3.5. Composición química: Los más recientes estudios demuestran que PmL se emplea alrededor del mundo para el tratamiento de diversas enfermedades o malestares. La actividad sanadora de PmL no se amerita a un solo compuesto, sino a la interacción de varios; los efectos son producto de la acción en conjunto de distintas sustancias y de su regulación mutua. (21)

Las investigaciones realizadas sobre PmL han revelado la presencia de mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos, un glucósido cromogénico iridoide denominado aucubósido (aucubina) y otro

glucósido llamado catapol. Tanto las hojas como las flores y el tallo poseen el glucósido aucubina. (21)

Las hojas contienen sustancias con propiedades antiinflamatorias. Del mismo modo, cuenta con diversos flavonoides, tales como apigenina, luteolina y escutellarina. (21)

Existen medicamentos a base de compuestos propios de PmL que se comercializan; sin embargo, se utiliza mayormente como remedio casero. (21)

1.3.6. Parte de la planta usada en medicina tradicional: Principalmente las hojas, la planta entera y la raíz. (20)

1.3.7. Formas de uso recomendadas: Decocción, infusión, jarabe, jugo de hojas frescas, tintura, extracto, cataplasma, etc. (20)

1.3.8. Uso en medicina tradicional: Entre los múltiples usos de esta planta en el campo de la salud humana se encuentran sus propiedades antiinflamatorias:

- El baño con la infusión de esta planta, junto con matico *(Aristeguieta glutinosa; Piper veneralense*) y

caballo chupa *(Equisetum giganteum L)* se usa para eliminar la irritación y la inflamación.(22)

- El jugo fresco extraído de las hojas se aplica en los ojos para tratar ardencias e inflamaciones.(22)
- La decocción de las hojas se utiliza para tratar las hinchazones e irritaciones del estómago, intestino, riñones, amígdalas, boca y muelas.(22)
- Las hojas tomadas en infusión se usan para tratar inflamaciones de los ovarios y el dolor de la garganta.(22)

1.3.9. Otras aplicaciones en la medicina: Esta planta se utiliza además como: diurético, **cicatrizante,** antihelmíntico, **antiespasmódico,** antiulceroso, para tratar espinillas y granos de la cara, es emoliente, depurativo.(23)

1.3.10. Posología: Para los casos de catarros bronquiales, se debe preparar un cocimiento con 100 gramos de hojas de llantén por litro de agua. Hervir 10 minutos. Se toma de 3 a 4 tazas al día. (24)

Contra la tos, se prepara un té con unos sesenta gramos de hojas en un litro de agua. Este té debe ser tomado tres veces por día. (24)

1.3.11. Propiedades del llantén: Antiinflamatorio. La actividad antiinflamatoria ha sido relacionada con los flavonoides específicamente los iridoides heterosídicos y los derivados del acido cafeíco. (20)

1.4. PLANTAS CON EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS SIMILARES AL *Plantago major L.*

Es conocida la relación existente entre las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (que provocan estrés oxidativo) con las enfermedades inflamatorias; por lo que extractos de plantas que presentan sustancias como flavonoides, polifenoles y tocoferol con capacidad antioxidante, en muchas ocasiones también presentan efecto antiinflamatorio. (25)

Existen plantas que forman parte de la familia Plantaginaceae que son usadas en el Ecuador para tratar diferentes enfermedades inflamatorias, entre las más importantes tenemos:

- ***Nuttallanthus subandinus.***

  Hábito: Hierba terrestre.

  Origen: Nativa.

  Uso medicinal: La decocción se bebe para tratar la "inflamación de calor" (Loja).

- ***Plantago afra L.***

  Hábito: Hierba terrestre.

  Origen: Introducida.

  Nombre común: Chacra romerillo.

  Uso medicinal: La decocción de esta planta, con romerillo grande de castillo (*Podocarpus oleifolius*), se usa para tratar la hinchazón de los pies (Loja).

- ***Plantago australis***.

  Hábito: Hierba terrestre.

  Origen: Nativa.

  Nombres comunes: Llantén, llantén de páramo.

  Uso medicinal: Esta planta es utilizada para tratar la "inflamación de calor" (hinchazón) (Loja). La infusión de la planta se toma para tratar la inflamación de los riñones (Chimborazo).

- ***Plantago lanceolata L.***

Hábito: Hierba terrestre.

Origen: Introducida.

Nombres comunes: Llantén macho, llantén menor, llantén silvestre.

Uso medicinal: Se usa para prevenir inflamaciones de la piel (Cotopaxi). Las hojas maceradas son utilizadas para tratar inflamaciones y dolores de cabeza (Chimborazo).

- ***Plantago linearis.***

Hábito: Hierba terrestre.

Origen: Nativa.

Nombres comunes: Cerro uña kushma, llantén.

Uso medicinal: Se bebe junto con valeriana del cerro *(Valeriana microphylla)*, valeriana (*Valeriana officinalis)* y "uña kushma del caliente" (*Oritrophium peruvianum*), para tratar la inflamación de los órganos sexuales femeninos (Loja).(22)

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. TÉCNICAS

Para el desarrollo de las técnicas de análisis de la droga de PmL se utilizaron diferentes equipos y reactivos, de los cuales se indican la marca, modelo y país de procedencia en el caso de los equipos y el laboratorio de procedencia en el caso de los reactivos.

Para los anexos fotográficos se usaron la cámara digital STAGE (2.0 mega pixeles) y la cámara celular NOKIA (1.5 mega pixeles).

2.1.1. RECOLECCIÓN Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El PmL fue recolectado el mes de mayo en horas de la mañana en el Barrio Las Palmeras de la parroquia de San Joaquín del cantón Cuenca. A fin de conocer el lugar exacto se procedió a establecer las coordenadas de recolección utilizando un Garmin GPS map 60Cx, el cual nos proporcionó los siguientes datos:

Posición:

Huso: 17 Zona: M

Coordenadas geográficas UTM: x: 0717317 m
y: 9679973 m

Altura: 2638 m (ANEXO 1)

Luego se realizó la selección de la droga (hojas) mediante la separación manual de las partes deterioradas, con signos de insectos, hongos, o que presentaron golpes o maltrato durante la recolección. Posteriormente la planta fue identificada por la Dra. Raffaella Ansaloni para desarrollar los estudios respectivos. (ANEXO 2).

2.1.2. SECADO

El secado es la etapa más crítica e importante. Generalmente se secan todas las plantas, excepto aquellas que van a ser empleadas para extraer aceites esenciales, preparar algunas tinturas y extractos. (26)

2.1.2.1. MÉTODO DE SECADO

Para el secado de la droga se empleó el método artificial.

Método artificial: es el más adecuado ya que permite un control de la temperatura, de la humedad ambiental y del tiempo que dura la operación.(26)

La desecación de las hojas de PmL utilizando el método artificial se realizó a través de un túnel de secado fabricado por Austro metal (Cuenca - Ecuador), el cual consiste en

recipientes móviles que circulan en sentido contrario al aire caliente, que se vuelve progresivamente más caliente desde la entrada hasta la salida. El tiempo de secado de la droga fue de 12 horas a 36°C. (ANEXO 3)

2.1.3. PULVERIZADO Y TAMIZADO

El pulverizado es un proceso mecánico que sirve para reducir el tamaño de partícula. El fin de este paso es el de aumentar la superficie de contacto de la droga con el solvente, lo cual facilita una mejor y mayor disolución de los principios activos. (26)

El pulverizado de la droga se realizó en morteros y en una licuadora OSTER (China), teniendo el cuidado de no sobrecalentar las cuchillas, para no afectar por el calor los componentes termosensibles. Una vez pulverizado se pasó la droga por un colador de cocina para obtener un mejor tamaño de partícula y luego se la almacenó.

2.1.4. ALMACENAMIENTO

Una hierba medicinal deshidratada tiene propiedades medicinales alrededor de un año, dependiendo de la parte de la planta, así las hojas tienen un período de vida útil de

12 a 18 meses. Después de ese tiempo sus principios activos se evaporan o se alteran. (26)

La droga pulverizada y tamizada de PmL fue almacenada en un frasco de vidrio cubierto con papel de aluminio para impedir el contacto con la luz, el polvo e insectos. Luego se etiquetó el frasco con los datos de identificación de la planta (nombre científico, nombre común), y la droga, persona que recolecta, lugar de recolección y fecha de recolección.

2.1.5. ENSAYOS MACROMORFOLÓGICOS

Las drogas son categorizadas de acuerdo a sus características sensoriales, macroscópicas y microscópicas. La calidad, identidad y pureza se obtienen a partir de estas observaciones y percepciones.(26)

Procedimiento:

Se tomó la droga fresca y se observó a simple vista y con ayuda de una lupa la morfología, el color y el olor. Además se determinó las dimensiones de la droga (largo y ancho), utilizando una regla graduada en milímetros, sacando el valor promedio de 30 mediciones.

2.1.6. ENSAYOS MICROMORFOLÓGICOS

El método se basa en la observación al microscopio de los tejidos de la droga cruda desecada para determinar estructura y elementos celulares que permitan identificar la especie.(26)

Procedimiento:

Al material vegetal fresco se le realizaron cortes longitudinales y transversales lo más fino posible empleando un bisturí. Los cortes de la muestra vegetal se colocaron en un portaobjetos y se observaron en un microscopio NIKON LABOPHOT (Japón) con objetivo de 10x.

2.1.7. PRUEBAS HISTOQUÍMICAS

2.1.7.1. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS DE ALMIDÓN

Procedimiento:

Se colocó en un extremo del portaobjetos una gota de agua destilada y una pequeña porción de la muestra triturada y tamizada y en el otro extremo una porción de muestra con

una gota de solución yódica (MERCK), se puso el cubreobjetos y se observó al microscopio con objetivo de 10x.

Interpretación:

Con el yodo los gránulos de almidón toman un color azul intenso y con el agua se observan gránulos de forma redondeada con una cruz en el centro. (27)

2.1.7.2. DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Procedimiento:

En un portaobjetos se colocó una pequeña porción de la muestra triturada y tamizada, se añadió una gota de floroglucina (MERCK) al 1% en etanol y se dejó que se seque en la estufa MEMMERT MS 300 (Alemania). Se añadió una gota de HCl concentrado (MERCK), se colocó un cubreobjetos y se observó con objetivo de 10x.

Interpretación:

Los vasos o fibras se deben teñir de color rojo. (27)

2.1.7.3. DETERMINACIÓN DE TRICOMAS EPIDÉRMICOS

Procedimiento:

Se colocó una pequeña cantidad de muestra con una gota de hidrato de cloral (MERCK) al 2%, (este reactivo disuelve almidones, proteínas, clorofila, resinas, aceites esenciales y produce expansión de las células retraídas), se hirvió suavemente sobre la llama de mechero hasta que clarifique y se observó al microscopio con objetivo de 10x cerrando un poco el diafragma.

Interpretación:

Los tricomas se observan como pelos alargados, unicelulares, cónicos, largos, afilados. (27)

2.1.7.4. DETERMINACIÓN DE CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO

En la misma preparación anterior se buscaron cristales en forma de prismas de color oscuro. (27)

2.1.7.5. DETERMINACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO

Procedimiento:

Se mezcló una pequeña cantidad de droga triturada con H_2SO_4 (MERCK) diluido al 1%.

Interpretación:

La efervescencia seguida de disolución indica la presencia de carbonato de calcio. (27)

2.1.7.6. DETERMINACIÓN DE PRINCIPOS AMARGOS Y ASTRINGENTES

Procedimiento:

El ensayo se realizó masticando el vegetal.

Interpretación:

Amargo: Si presenta un sabor característico como de la hiel, que produce una sensación desagradable y duradera.

Astringente: Si en contacto con la lengua se produce en una sensación de sequedad intensa y amargor.

2.1.8. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.

Para los parámetros físico-químicos se trabajó con la droga seca**.**

Para pesar la droga se utilizó la balanza METTLER PC 440 delta range (Alemania) y para realizar secado en el caso de la determinación del contenido de humedad y de la determinación de sustancias solubles se usó la estufa MEMMERT MS 300 (Alemania).

2.1.8.1. DETERMINACIÓN DE HOJAS ENNEGRECIDAS

Procedimiento:

Se pesó 5 g de la muestra de ensayo y se procedió a la separación manual de las hojas ennegrecidas.

Cálculos:

El porcentaje (%) de hojas ennegrecidas (He) se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$He = (m/M) \times 100 \ (\%)$$

Donde:

m: masa de hojas ennegrecidas (g).
M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).
100: factor matemático para los cálculos.(26)

2.1.8.2. DETERMINACIÓN DE PARTES DE LA PROPIA PLANTA

Los principios activos no se distribuyen uniformemente por toda la planta, éstos se localizan preferentemente en algunas partes y órganos; la utilización de partes de la planta que no corresponda a la descripción botánica da como resultado una materia prima pobre en sustancias activas e incluso desprovistas de ellas.

Procedimiento:

Se pesó 5 g de la muestra de ensayo y se procedió a separar manualmente otras partes de la propia planta no pertenecientes a la droga.

Cálculos:

El porcentaje (%) de otras partes de la propia planta (Pp) se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$Pp = (m/M) \times 100 \ (\%)$$

Donde:

m: masa de otras partes de la propia planta (g).

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).

100: factor matemático para los cálculos.(26)

2.1.8.3. DETERMINACIÓN DE MATERIAS EXTRAÑAS

La obtención de drogas vegetales en condiciones de completa pureza es bastante difícil. La naturaleza y la alta tasa de elementos extraños pueden determinar el rechazo de la droga. Normalmente las farmacopeas toleran hasta un máximo de un 2%.(26)

2.1.8.3.1. DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA EXTRAÑA

Procedimiento:

Se pesó 5 g de la muestra de ensayo y se realizó la separación manual de la materia orgánica extraña.

Cálculos:

El porcentaje (%) de materia orgánica extraña (Mo) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Mo = (m/M) \times 100 \ (\%)$$

Donde:

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).

m: masa de materia orgánica extraña (g).

100: factor matemático para los cálculos.(26)

2.1.8.3.2. DETERMINACIÓN DE MATERIA INORGÁNICA EXTRAÑA

Procedimiento:

Se pesó 5 g de la muestra de ensayo y se procedió a la separación de todas las partículas de tierra, arena y piedras pequeñas presentes en la misma.

Cálculos:

El porcentaje (%) de materia inorgánica extraña (Mi) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Mi = (m/M) \times 100 \ (\%)$$

Donde:

M: masa inicial de la muestra de ensayo (g).

m: masa de materia inorgánica extraña (g).

100: factor matemático para los cálculos.(26)

2.1.8.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal. El contenido de humedad en la planta fresca varía del 60 a 80% y durante el proceso de secado se llega a conseguir que el contenido de agua en la droga disminuya a un 5% o a un 12%.(26)

El contenido de agua en las drogas vegetales debe variar entre el 8 al 14% para garantizar su conservación y evitar el deterioro. Pero para una buena conservación de las drogas, el contenido de agua debe ser inferior al 10%.(26)

MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Procedimiento:

De la muestra de ensayo pulverizada y tamizada, se pesaron 2 g (con un error máximo de 0,5 mg) y se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada y se secó a 105°C durante 3 horas. Luego la cápsula se dejó enfriar en una desecadora hasta temperatura

ambiente y se pesó; nuevamente se colocó en la estufa durante 1 hora y se repitió el procedimiento hasta obtener masa constante, es decir que no difieran las pesadas en más de 0,5 mg. Para obtener la masa constante el tiempo de calentamiento y pesada se realizó en intervalos de 30 minutos. El ensayo se realizó por duplicado.

Cálculos:

El contenido de humedad (H) de la muestra de ensayo expresado en % se calculó por la siguiente fórmula:

$$H=\frac{M_2 - M_1}{M} \times 100 \quad (\%)$$

Donde:

M_2: masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g).
M_1: masa de la cápsula con la muestra desecada (g).
M: masa de la muestra de ensayo.(26)

2.1.8.5. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Procedimiento:

En un crisol de porcelana previamente tarado, se pesó (con un error máximo de 0,5 mg) 2 g de la muestra de ensayo

pulverizada y tamizada; se calentó suavemente hasta carbonizar y posteriormente se incineró en un horno mufla HERAEUS KR 260 (Alemania) a una temperatura de 750°C, durante 2 horas. Luego se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó. El proceso se repitió hasta obtener masa constante. El ensayo se efectuó por duplicado.

Cálculos:

La cantidad de cenizas totales en base anhidra (Ct) se calculó por las fórmulas siguientes:

$$C_1 = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 \qquad Ct = \frac{C_1 \times 100}{100 - H}$$

Donde:

C_1: cenizas totales en base hidratada (g).

M: masa del crisol vacío (g).

M_1: masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M_2: masa del crisol con las cenizas (g).

H: % de humedad.

100: factor matemático para los cálculos.(26)

2.1.8.6. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES

Se basa en la extracción de las sustancias solubles en agua, etanol o una mezcla hidroalcohólica mediante maceración y luego evaporación hasta sequedad de una alícuota del macerado. Esto nos ayuda a valorar el vehículo más apropiado a la hora de formular la droga cruda en un fitoterápico.(26)

Procedimiento:

Se pesó 5 g de muestra pulverizada y tamizada y se transfirieron a un frasco cónico con tapa; se añadió 100 ml de etanol al 90% (Lab. Promeclin) y se agitó durante 6 horas en el shaeker NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC MS_2 (U.S.A.), luego se dejó en reposo hasta el día siguiente, se agitó 30 minutos y se filtró por papel. Se tomó una alícuota de 20 ml, se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada, se evaporó sobre baño de agua MEMMERT M 270 (Alemania), luego se desecó en estufa a 105°C durante 3 horas, se enfrió y se pesó. El procedimiento se realizó por duplicado.

Cálculos:

El porcentaje (%) de sustancias solubles en base anhidra (Ss) se calculó por la siguiente fórmula:

$$S_s = \frac{R \times 500 \times 100}{M \times (100-H)} \quad (\%)$$

Donde:

H: humedad de la muestra (%).

M: masa de la muestra (g).

R: residuo de la muestra (g).

100 y 500: factores matemáticos para los cálculos.(26)

2.1.9. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS

La invasión de microorganismos en una planta puede ocasionar la disminución de los principios activos y por lo tanto altera la calidad de la droga por la presencia de estos elementos nocivos. Cuanto más rica en sustancias nutritivas es una droga y el proceso de secado se lo realice de manera muy lenta el número de gérmenes presentes en la droga será mayor, por esta razón el número de microorganismos de una droga a otra varía notablemente.(26)

Generalmente se dice que las drogas durante su obtención y tratamiento se contaminan con gérmenes provenientes del suelo, del ambiente y de la tierra. Muchos microorganismos pueden contaminar la droga seca, siendo los más peligrosos los hongos filamentosos ya que producen micotoxinas y algunas especies son productoras de aflatoxinas las cuales son consideradas altamente tóxicas.(26)

Los límites establecidos para la contaminación microbiana están de acuerdo al uso que se le va a dar al material en sí mismo. Así por ejemplo, los límites microbianos para las drogas de uso interno se indican en la tabla 2.1.

Limites de contaminación microbiana para drogas de uso interno según la propuesta de B. Frank.

Unidad	Máximo Parámetro
UFC/g	1×10^5 Bacterias aeróbicas
UPC/g	1×10^3 Mohos y levaduras

UFC/g	1×10^1 Escherichia coli
UFC/g	1×10^3 Otras enterobacterias

TABLA 2.1.- Modificada por B. Frank.(26)

Donde:

UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo o ml de muestra.
UPC/g: Unidades propagadoras de colonias por gramo o ml de muestra.

Para el análisis microbiológico se empleó la técnica del Recuento estándar en placa (REP), indicado en el flujograma integrado expuesto en el Anexo 4.

Cálculos:

Para calcular el número de UFC/g ó ml y UPC/g ó ml de muestra se efectuaron los siguientes pasos:

- Se eligieron las cajas que presentaron entre 30 y 300 colonias.

- Se procedió a contar las colonias en el contador QUEBEC N° 3327 (U.S.A.) y a anotar los datos para luego realizar los cálculos con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0,1n2)d}$$

En donde:

$\sum C$ = suma de colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas.

n1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada.

n2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada.

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos.

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa.(26)

2.1.10. ESTUDIO FITOQUÍMICO

La marcha fitoquímica se realizó de acuerdo a los flujogramas expuestos en los Anexos 5 al 10.

2.1.10.1. ENSAYOS SOBRE LAS FRACCIONES A – E.

2.1.10.1.1. AMINOÁCIDOS - ENSAYO DE NINHIDRINA

Procedimiento en papel:

Se colocó 1 gota de solución problema en una tira de papel filtro. Se dejó secar en la estufa. Luego se añadió 1 gota de reactivo de ninhidrina (MERCK) al 2 % en agua sobre la mancha de la muestra. Se regresó la tira a la estufa y se esperó a que se seque.

Interpretación:

El desarrollo de coloraciones violeta, azul o rosada se considera prueba positiva.(27)

Procedimiento en tubo:

Se colocó 1 ml del extracto en un tubo de ensayo limpio, se añadió 1 ml de ninhidrina al 2% y se calentó en un baño de agua por 5 a 10 minutos.

Interpretación:

Se considera positiva la prueba si aparece una coloración azul violácea.(27)

2.1.10.1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS - ENSAYO DE $FeCl_3$

Procedimiento:

Se tomó 1 ml de solución en un tubo de ensayo limpio. Se añadió 1 gota de $FeCl_3$ (MERCK) al 1% en agua y se mezcló.

Interpretación:

La aparición de coloraciones violeta, verde, azul u oscura se considera prueba positiva.

2.1.10.1.3. FLAVONOIDES - ENSAYO DE SHINODA

Procedimiento:

Se colocó 1ml de solución en un tubo de ensayo limpio. Se añadió algunas limaduras de Mg (MERCK) y sujetando el tubo con una pinza se agregó cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado.

Interpretación:

La aparición de coloraciones naranja a violeta es prueba positiva para la presencia de flavonoides.

2.1.10.1.4. LEUCOANTOCIANIDINAS - ENSAYO DE ROSENHEIM

Procedimiento:

Se tomó 1 ml de solución en un tubo de ensayo limpio. Se añadió 0,5 ml de HCl concentrado. Se mezcló, luego se calentó durante 10 minutos a 100°C en el baño de agua y se enfrió. Se añadió 0,4 ml de alcohol amílico (MERCK) y se agitó. Finalmente se dejó separar las fases.

Interpretación:

La prueba se considera positiva si aparece coloración en la fase amílica que vaya desde el carmesí oscuro al rosado débil.

2.1.10.1.5. TANINOS - ENSAYO DE LA GELATINA-SAL

Procedimiento:

Se colocó 1 ml de solución acuosa neutra en un tubo de ensayo. Luego se añadió 1 ml de solución de gelatina al 1% que contenga 10 % de cloruro de sodio (MERCK).

Interpretación:

La formación de un precipitado se considera prueba positiva.

2.1.10.1.6. QUINONAS - ENSAYO DE BORNGTRAGER

Procedimiento:

Se tomó 3 ml de solución clorofórmica y se lo llevó a sequedad. Se redisolvió en 5 ml de etanol (Lab. promeclin) al 70%:H_2O destilada (1:7). Después se añadió 1 ml de agua oxigenada de 20 volúmenes (Lab. Promeclin), 1 ml de H_2SO_4 (MERCK) al 50% y se calentó la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 10 - 15 minutos. Se dejó enfriar y luego se extrajo en un embudo de separación con 5ml de benceno (MERCK). Por último se retiró 2 ml de la fase orgánica y se agitó en otro tubo con 1 ml de solución de NaOH (MERCK) al 5% en NH_4OH (MERCK) al 2%.

Interpretación:

La prueba se considera positiva cuando aparecen coloraciones que van del rosado al rojo intenso en la capa alcalina.

2.1.10.1.1.7. TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES - ENSAYO DE LIEBERMAN-BURCHARD

Procedimiento:

Se colocó 0,5 ml de muestra clorofórmica anhidra en un tubo de ensayo limpio y seco. Se añadió 0,5 ml de anhídrido acético (MERCK) y se agregó cuidadosamente por la pared del tubo 1 gota de H_2SO_4 concentrado (MERCK).

Interpretación:

La aparición de coloraciones violeta, verde, azul se considera positiva.

2.1.10.1.8. CARDIOTÓNICOS - ENSAYO DE KEDDE

Procedimiento:

A 1 ml de la fase orgánica se la llevó a sequedad, se redisolvió en 1 ml de alcohol y se añadió 0,5 ml de reactivo de Kedde (MERCK) recién preparado.

Interpretación:

Se considera positiva la prueba si aparece una coloración púrpura o violácea.

2.1.10.1.9. ENSAYOS PARA ALCALOIDES

Procedimiento:

Se colocó 0,5 ml de solución acuosa ácida en 6 tubos de ensayo limpios. Se añadió una gota de reactivo de Dragendorff (MERCK), Mayer (MERCK), Marmé (MERCK), Wagner (MERCK), ácido fosfowolfrámico (MERCK) al 3% y ácido fosfomolíbdico (MERCK) al 3%.

Interpretación:

Se considera prueba positiva cuando aparecen precipitados en por lo menos 3 tubos.

2.1.10.2. REACCIONES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS METABOLITOS

2.1.10.2.1. ENSAYOS PARA EL RECONOCIMIENTO DE GLÚCIDOS

- **ENSAYO DE FHELING**

Permite reconocer en un extracto vegetal la presencia de azúcares reductores.

Procedimiento:

Se evaporó el solvente del extracto en baño de agua y el residuo se disolvió en 1 ml de agua. En caliente se añadió un volumen igual de reactivo de Fheling (MERCK).

Interpretación:

La aparición de un precipitado amarillo o rojo indica que la prueba es positiva.

- **ENSAYO DE MOLISH**

Se aplica para diferenciar glúcidos solubles de insolubles.

Procedimiento:

Se agregó 0,25 ml de solución de alfa naftol (MERCK) al 1% a 2 ml de la sustancia problema y en otro tubo con 2 ml del problema se añadió 0,25 ml de la solución de timol (MERCK) al 1% Por las paredes de cada tubo se

añadió cuidadosamente 1 ml de H_2SO_4 concentrado hasta que se formaron dos capas.

Interpretación:

La aparición de una coloración violeta en el caso de alfa naftol y roja con el timol en la interfase de los líquidos indica que la prueba es positiva.

- **ENSAYO DE LAS PENTOSAS**

Se utiliza para la identificación de pentosas.

Procedimiento:

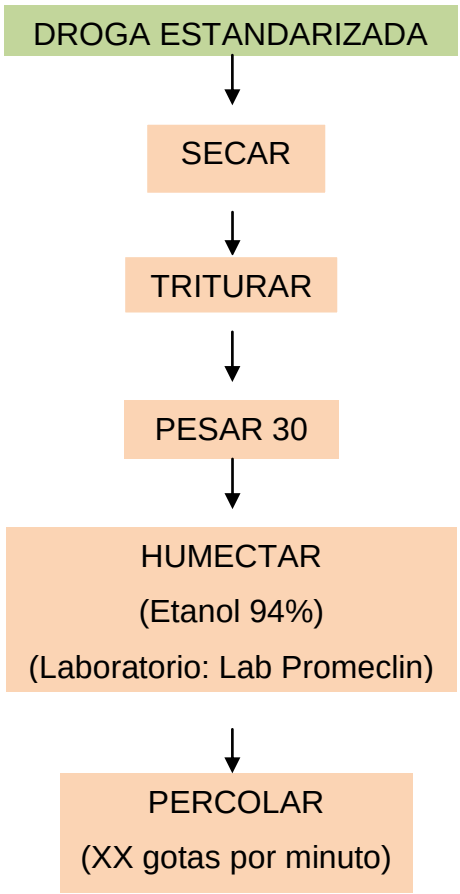
En un tubo se colocaron 2 ml de la solución problema, se añadió igual volumen de HCl concentrado y varios cristales de floroglucina (MERCK). Se colocó el tubo en un baño a ebullición.

Interpretación:

La aparición de una coloración roja durante el calentamiento se considera positiva.

2.1.11. PREPARACIÓN DE LA TINTURA DE LLANTÉN AL 30%

TINTURA AL 30%



Para llevar a cabo la percolación se realizaron los siguientes pasos:

- Armar el equipo de percolación.
- Colocar en el fondo del percolador una capa de algodón humedecido en alcohol.

- Pasar el humectado al percolador y presionarlo moderadamente con un pilón.
- Cubrir la droga con papel filtro y colocar bolas de cristal.
- Añadir el etanol al 94%, dejar fluir el solvente y cerrar la llave del equipo.
- Agregar más solvente hasta 1 cm por encima de la droga.
- Dejar en maceración por 24 horas.
- Realizar la percolación propiamente dicha a razón de XX gotas por minuto.
- El volumen final a obtener es de 100 ml. (ANEXO 11)

A partir de la tintura del Llantén al 30% se prepararon las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg (ANEXO 12), las cuales fueron administradas a los ratones de los lotes 1, 2 y 3 respectivamente para evaluar su efecto antiinflamatorio.

2.1.12. ACTIVIDADES REALIZADAS PREVIO AL ANÁLISIS FARMACOLÓGICO

Estas actividades incluyeron la valoración de la vía de administración así como la práctica de la técnica, para lo que se utilizaron un total de seis ratones.

2.1.12.1. VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Antes del análisis farmacológico se valoró la vía de administración para asegurar que el medicamento sea absorbido y llegue al lugar de acción.

Para este fin se utilizaron ratones a los cuales se les dejó en ayuno la noche anterior, al día siguiente se les anestesió con cloroformo (Lab. Promeclin) para luego administrar 0,4 ml de una solución de azul de metileno (MERCK) al 0,01% por vía oral a través de una cánula intragástrica. Luego de 15 minutos se procedió a realizar la disección de la cavidad abdominal de los ratones y se llevó a cabo una exploración física interna. (ANEXO 13) (28)

2.1.12.2. PRÁCTICA DE LA TÉCNICA

La práctica de la técnica se realizó con el fin de adquirir destreza para hacer más fácil el desarrollo de la misma durante la evaluación del efecto antiinflamatorio del PmL.

Para realizar esta práctica se utilizó a otro grupo de ratones, los cuales fueron anestesiados con cloroformo. Se

depiló el lomo de los ratones y se les realizó una incisión para introducir un pellet de algodón estéril, luego se suturó la herida y se aplicó alcohol yodado como antiséptico (Lab. Promeclin). Después de algunos días se extrajeron los granulomas. (ANEXO 14)

2.1.13. ANÁLISIS FARMACOLÓGICO

2.1.13.1. MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACIÓN: GRANULOMA INDUCIDO POR DISCO DE ALGODÓN

La técnica para determinar el efecto antiinflamatorio utilizando una mota de algodón fue desarrollada por Meier R, Schuler W and Desaulles P.(29), a la cual se le han realizado varias modificaciones.

Para la realización de nuestra tesis hemos seguido el modelo experimental de inflamación de granuloma inducido por discos de algodón propuesto por Molina Vivian,(30) tomando como referencia para la realización de los cálculos los utilizados en Evaluación preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de *Morinda citrifolia L.* (31)

Fundamentación teórica

La mayoría de los experimentos para evaluar la acción antiinflamatoria involucran el uso de granulomas por cuerpos extraños. La implantación subcutánea de un disco de algodón en ratas resulta en la formación de un granuloma en el sitio de implante. Los primeros eventos ocurren en la vecindad del disco de algodón y resultan en la generación de sustancias quimiotácticas para Nts y Mos, las cuales pueden ser producto del sistema de complemento, el sistema de quinina o la generación de productos de la oxidación del ácido araquidónico. Esta primera fase comprende una acumulación de fluido y material proteico junto con una infiltración de Nts. (30)

El granuloma formado por 7 días es caracterizado por la formación de una cápsula fibrosa vascularizada que contiene fibroblastos y células mononucleares las cuales son ricas en N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG), marcador de enzimas lisosomales. Una activa infiltración de células polimorfonucleares (PMN) también caracteriza esta fase del proceso inflamatorio. (30)

Protocolo experimental

Para la evaluación del efecto antiinflamatorio de la droga de PmL se utilizaron ratones machos Swiss albinos, los cuales fueron pesados en la balanza OHAUS Scout II SC 2020 (Canadá), identificados por la inscripción en números romanos y distribuidos al azar para formar los 5 lotes de 6 animales**.**

Los pesos de los ratones de cada uno de los lotes se indican a continuación:

PESO DE LOS RATONES		
N° de Lote	**N° de ratón**	**Peso de ratones (g)**
LOTE 1 100 mg/kg	I	27,3
	II	26,2
	III	26,3
	IV	30,1
	V	25,8
	VI	24,7
LOTE 2 200 mg/kg	I	25,2
	II	27,7
	III	25,8
	IV	24,7
	V	29,9
	VI	26,3
LOTE 3 300 mg/kg	I	24,4
	II	24,4
	III	28,4
	IV	29,6
	V	26,6

	VI	25,3
LOTE 4 Blanco Alcohol en suero 10 mg/kg	I	25,6
	II	25,3
	III	25,05
	IV	25,4
	V	25
	VI	24,7
LOTE 5 Patrón Indometacina 10 mg/kg	I	28,7
	II	25
	III	27,6
	IV	27,3
	V	24,7
	VI	26,6

TABLA 2.2.- Peso individual de los ratones por lotes

Luego los ratones fueron anestesiados y rasurados en el lomo; posteriormente se les realizó una incisión de aproximadamente 2 cm en la mitad del dorso lateral. Finalmente se les introdujo de manera subcutánea 1 pellet de algodón estéril de aproximadamente 15 mg(32), los cuales fueron pesados en la balanza analítica BOECO BBL 31 (Alemania). A continuación se suturó la herida y sobre ella se aplicó alcohol yodado para evitar infecciones. (ANEXO 15)

Al día siguiente se realizó la aplicación oral de la tintura de Llantén al 30% a los lotes 1, 2 y 3 a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso respectivamente; alcohol en suero fisiológico (Fisiol UB, Lab. Lamosan, lote 09030302) como blanco al lote 4 a dosis de 10 mg/kg de peso; y al lote 5 solución de Indometacina (Indocid cápsulas de 25 mg, Lab. MSD, lote P346) como patrón a dosis de 10 mg/kg. (ANEXO 16) Ésta aplicación se efectuó por 7 días, durante los cuales se observaron los parámetros de la inflamación como la tumefacción, rubor, calor, dolor y pérdida o disminución de la función (ANEXO 17). Al octavo día se sacrificaron los animales en atmósfera de éter (Lab. Promeclin) y se realizó la exéresis de los granulomas, los cuales fueron pesados en el momento de la extracción

determinando sus pesos húmedos. Posteriormente se secaron en estufa a 60°C durante 24 horas y fueron pesados determinándose sus pesos secos. (ANEXO 18, 19)

Con los datos recolectados se calcularon los valores de contenido acuoso y contenido fibrogranuloso, que fueron analizados estadísticamente entre sí y en comparación con los de los grupos blanco y patrón. Por último se determinó el porcentaje de inhibición de la inflamación.

2.1.13.1.1. PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN

Para determinar el grado de inflamación se utilizó la siguiente leyenda:

Leve:	+
Moderada:	++
Intensa:	+++
Ausencia:	-

Calor: Para establecer el grado de calor presentado por el ratón se utilizó el sentido del tacto, éste se basó en tocar

con los dedos la zona donde se implantó el pellet de algodón determinando así su intensidad.

Dolor: Para evaluar el dolor se procedió a estimular la zona afectada mediante el pinchazo con la cabeza de una aguja, midiéndose la reacción del ratón como intensa si apenas se le tocaba chillaba, moderada si al contacto con la aguja cerraba sus ojos o se esquivaba, leve si al pincharle apenas realizaba un ligero movimiento y ausencia si no manifestaba ningún tipo de reacción.

Rubor: Para la medición del rubor se utilizó el sentido de la vista, es decir se procedió a la observación de la zona de la herida del ratón, en donde se determinó por el color el grado de rubor o enrojecimiento.

Tumefacción: Para determinar el parámetro de tumefacción, se inspeccionó visualmente la zona de implante del pellet de algodón, calificándose como intensa si la zona se encontraba muy hinchada, moderada si la zona presentaba una hinchazón media, leve si la zona presentaba una ligera hinchazón y ausencia de la misma si la zona afectada presentaba sólo el abultamiento por parte del pellet de algodón.

Pérdida del funcionamiento: Para conocer si hay pérdida o disminución de la función del órgano o tejido afectado se realizó la observación del ratón durante todos los días de tratamiento, designándose como ausencia si el ratón presentaba el mismo comportamiento o movilidad que tenía antes del tratamiento farmacológico; se calificaría como grado intenso si como consecuencia de la lesión el ratón presenta una ausencia de movilidad notable; moderado si se observa una ligera falta de movilidad y como leve si apenas se produce una pequeña variación en el movimiento.

2.1.13.2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para valorar las estimaciones cualitativas se utilizó el análisis de proporciones y para las pruebas cuantitativas la t de student, mediante el análisis de datos referido en las herramientas de Microsoft - Excel 2007.

2.1.13.2.1. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CUALITATIVO

ANÁLISIS DE PROPORCIONES

Definición:

"El análisis de proporciones es el único análisis estadístico aplicable a estudios cualitativos y nos indica si nuestro estudio es significativo. Este análisis consiste en el cálculo de límites superior e inferior de la población estudiada".(33)

Cálculo de límites:

$$L = p \pm Z\ \alpha/_2 * es(p)$$

En donde:

L = límite (límite superior si se suma y límite inferior si se resta)

p = probabilidad de que ocurra (casos + o -)

$$p = n/N$$

Z = para 95% de confianza= 1,96 $Z\ \alpha/_2 = 1{,}96$

es(p)= error del estimador

$$es(p) = raíz\ (p*q/n) *raíz\ [(N-n)/(N-1)]$$

q = probabilidad de que no ocurra

$$q = 1-p$$

N = total de casos

n = total de casos + o – según el caso

El análisis se hace con el mayor valor (n).

2.1.13.2.2. METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS CUANTITATIVO

PRUEBA T DE STUDENT

Definición:

"*Test que se utiliza para comparar dos tratamientos. Este test nos permite, basados en la desviación estándar, determinar si existen diferencias significativas en la variable que analizamos, o sea que hemos medido en dos grupos, con individuos o muestras distintas para cada grupo (test t no pareado) o cuando tenemos el mismo grupo, evaluado con un antes y después (test t pareado)".*(34)

Formulación de hipótesis:

Para la evaluación farmacológica de las dosis de la tintura de PmL se plantearon dos hipótesis, una hipótesis nula (Ho) y una hipótesis alternativa (H1).

Se obtuvieron valores de la t estadística o experimental, de la t crítica, además de los valores de probabilidad (P) a partir de los cuales se rechazo o aceptó la hipótesis nula, en donde:

- Si P es menor o igual que 0,05 se rechaza la Ho por haber diferencias estadísticamente significativas.
- Si P es mayor que 0,05 se acepta la Ho por no haber diferencias estadísticamente significativas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MACROMORFOLÓGICO

Los resultados del análisis macromorfológico de la droga en estudio se indican en la tabla 3.1.

Color de las hojas	En el haz y envés verde claro
Consistencia	Lisa
Olor	Característico
Sabor	Amargo
Tamaño	13,3 cm de largo y 7,9 cm de ancho
Presencia de vellosidades	Carece de vellosidades
Forma de la hoja	Ovalada
Borde de la hoja	Ligeramente dentado
Base foliar	Redondeada
Disposición de las hojas	Basales dispuestas en rosetas

Tabla 3.1.- Resultado del análisis macromorfológico de la droga

Figura 3.1.- Análisis macromorfológico de droga de PmL Referencia (35)

Los datos anteriores se compararon con material de referencia(21) (35), por lo que la planta analizada corresponde a *Plantago major L.*

3.1.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROMORFOLÓGICO

Corte Longitudinal: En este corte se observó la presencia de estomas, los cuales fueron mejor identificados en el corte transversal.

Corte transversal: En este corte se pudo observar la presencia de células, estomas diacíticos en número de 7 a 9 por campo y tricomas.

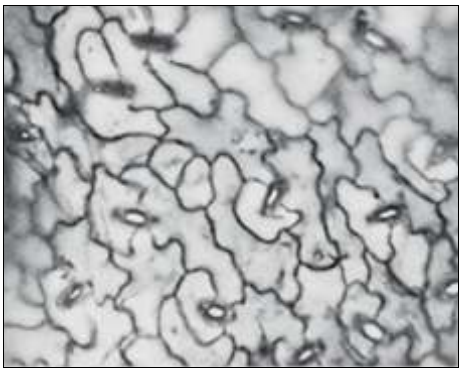


Figura 3.2.- Corte de la hoja de PmL (21)

Al realizar el análisis micromorfológico de la droga se determinó que las estructuras observadas corresponden con las establecidas(21) para la especie de PmL.

3.1.3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS HISTOQUÍMICAS

Los resultados de las pruebas histoquímicas se muestran en la tabla 3.2.

Determinación	Resultado de la observación
Células de almidón	Negativo
Lignina	Negativo
Tricomas epidérmicos	Tricomas unicelulares
Cristales de oxalato de calcio	Cristales en forma de prismas
Carbonato de calcio	Negativo
Principios amargos y astringentes	Sabor amargo

TABLA 3.2.- Resultados de pruebas Histoquímicas

Al realizar las pruebas histoquímicas lo que se pudo determinar fue la presencia de tricomas unicelulares, cristales, principios amargos y astringentes.

3.1.4. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Para determinar si los resultados de los parámetros físico-químicos de *Plantago major L* se encuentran dentro del rango permisible se utilizó como referencia algunos datos que se encuentran establecidos para la droga *Plantago lanceolata L*, en la Norma Ramal del MINSAP (NRSP

303:1992)(36) por pertenecer estas drogas a la misma familia ***Plantaginaceae.*** Los límites establecidos se presentan en la tabla 3.3:

Análisis físico-químico

Análisis físico	**Norma (%)**
Materia orgánica	máx.2
Materia inorgánica	máx.2
Hojas ennegrecidas	máx.6
Análisis químico	
Humedad	máx.14
Cenizas totales	máx.16
Sustancias solubles en etanol al 90%	mín.30

TABLA 3.3.- Límites máximos establecidos para los parámetros físico-químicos de la droga *Plantago lanceolata L.*

3.1.4.1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

Los resultados de los parámetros físicos se indican en la tabla 3.4.

Análisis físico	**Resultado (%)**

Materia orgánica	0,35%
Materia inorgánica	0,24%
Hojas ennegrecidas	3,1%

TABLA 3.4.- Resultados del análisis físico de la droga de PmL.

Los resultados que se obtuvieron con los parámetros físicos de la droga se encontraron dentro de los rangos permitidos por la Norma Ramal, por lo que la calidad de la misma con respecto al análisis físico es aceptable.

3.1.4.2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS

Los resultados de los parámetros químicos se muestran en la tabla 3.5.

Análisis químico	**Resultados (%)**
Humedad	5,2%
Cenizas totales	11,27%
Sustancias solubles en etanol al 90%	52,3%

TABLA 3.5.- Resultados del análisis químico de la droga de PmL.

En cuanto al análisis químico de la droga se encontró que los resultados obtenidos cumplieron con los límites establecidos por la Norma Ramal, así el contenido de humedad de la droga fue de 5,2%, lo cual garantiza una buena conservación por inactivación de las enzimas. Por otro lado se determinó un 11,27% de cenizas totales y un 52,3% de sustancias solubles, valores que se consideran aceptables pues su cantidad es menor a la máxima permitida por la norma.

3.1.5. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS

Los resultados del análisis microbiológico de la droga de PmL se aprecian en la tabla 3.6.

Microorganismo	Resultado	Máximo parámetro
Bacterias aerobias	$3,1 \times 10^3$ UFC/g	1×10^5 UFC/g
Mohos y levaduras	$6,4 \times 10^2$ UPC/g	1×10^3 UPC/g
Coliformes totales	0 UFC/g	1×10^3 UFC/g
Coliformes	0 UFC/g	1×10^1 UFC/g

fecales		

TABLA 3.6.- Resultados del análisis microbiológico.

El análisis microbiológico de la droga seca de PmL determinó que los resultados obtenidos no excedieron los límites máximos establecidos según la propuesta de B. Frank.

Tomando en consideración el análisis físico-químico y el análisis microbiológico se estableció que la droga utilizada estuvo en condiciones óptimas para la realización de la investigación farmacológica.

3.1.6. RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

Convenciones para la interpretación de resultados

Resultado	Asignación
Negativo	-
Dudoso	+/-
Positivo	+
Francamente positivo	++
No determinado	ND

TABLA 3.7.- Leyenda de interpretación de los resultados de la marcha fitoquímica.

Los resultados de los metabolitos encontrados en la droga de PmL se presentan en las siguientes tablas:

FRACCIÓN A	
Metabolito	**Resultado**
Aminoácidos	
Ensayo en el papel	++
Ensayo en el tubo	++
Flavonoides	++
Leucoantocianinas	+
Compuestos fenólicos	++
Taninos	+

TABLA 3.8.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción A.

FRACCIÓN B	
Metabolito	**Resultado**
Triterpenos y/o esteroides	++

Flavonoides	++

TABLA 3.9.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción B.

FRACCIÓN E	
Metabolito	**Resultado**
Flavonoides	++
Leucoantocianinas	++
Compuestos fenólicos	+
Taninos	+
Alcaloides:	
Dragendorff	+
Wagner	+
Ácido fosfomolíbdico	++
Ácido fosfowolfrámico	++

TABLA 3.10.- Resultados de los metabolitos encontrados en la Fracción E.

Al realizar el análisis fitoquímico se determinó la presencia de los siguientes metabolitos: aminoácidos, taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, leucoantocianidinas, triterpenos y/o esteroides y alcaloides. (ANEXO 20)

3.1.7. RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE OTROS METABOLITOS

3.1.7.1. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE GLÚCIDOS

Los resultados para la determinación de glúcidos se muestran en la tabla 3.11.

Ensayo	Resultado
Ensayo de Fheling	Dudoso
Ensayo de Molish	Positivo con timol, negativo con alfa naftol
Ensayo de las pentosas	Positivo

TABLA 3.11.- Resultados de la determinación de glúcidos.

Para la identificación de metabolitos como los glúcidos se realizaron diversos ensayos, los cuales determinaron que la droga de PmL si contenía glúcidos, comprobándose así lo establecido en las referencias bibliográficas(21).

3.1.8. RESULTADO DE LA VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Luego de los 15 minutos de administración del azul de metileno se realizó la disección de la cavidad abdominal de los ratones observándose este compuesto en el estómago e intestino de los mismos, este resultado nos garantiza que la dosis que se va a utilizar llegará a su estómago, tal como se puede demostrar en el ANEXO 21.

3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.2.1. ANÁLISIS CUALITATIVO

3.2.1.1. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN

De los parámetros de la inflamación: calor, dolor, rubor, tumefacción y pérdida o disminución de la función, se decidió tomar como referencia de análisis el grado intenso (+++) de dolor y tumefacción debido a que éstos resultaron ser los más interesantes al momento de valorarlos y permitieron tener una mejor apreciación de cómo actúan las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de la tintura de PmL al compararlas con el Blanco y con el patrón de Indometacina.

El proceso diario de la evolución del dolor intenso se indica en la tabla 3.12:

DOLOR INTENSO - DOSIS DE 100, 200 Y 300 mg/kg FRENTE AL BLANCO Y AL PATRÓN DE INDOMETACINA

DROGA Y DOSIS	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7
PmL 100 mg/kg	4 de 6	4 de 6	4 de 6	4 de 6	4 de 6	2 de 6	2 de 6
PmL 200 mg/kg	3 de 6	3 de 6	2 de 6	1 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6
PmL 300 mg/kg	3 de 6	3 de 6	1 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6
Blanco	4 de 6	5 de 6	4 de 6	6 de 6	5 de 6	5 de 6	3 de 6
Indometacina	4 de 6	3 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6

TABLA 3.12.- Dolor intenso en los ratones tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, comparado con el Blanco y con el Patrón de Indometacina**.**

El proceso diario de la evolución del dolor intenso (ANEXO 22) para los diferentes lotes de ratones se muestra en la figura 3.3:

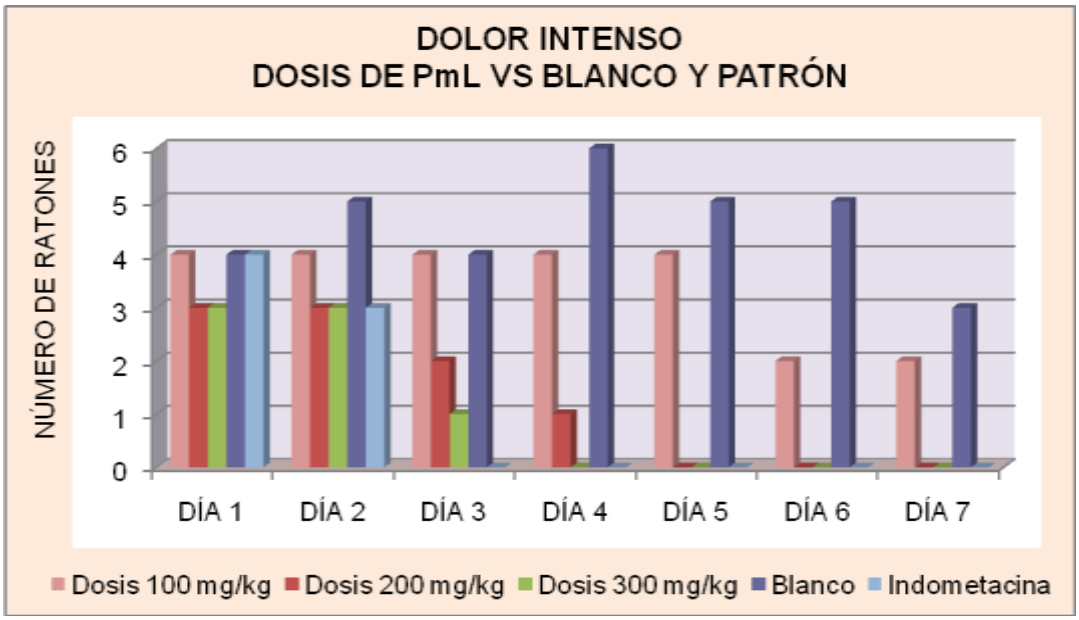


FIGURA 3.3.- Histograma del parámetro dolor intenso de las dosis de PmL frente al Blanco y al Patrón de Indometacina.

Interpretación de Resultados:

En la figura 3.3, al comparar las dosis de la tintura de PmL con el blanco y con el patrón de Indometacina se observa que el tratamiento farmacológico con la dosis de 100 mg/kg produce una escasa disminución del dolor intenso, lo que significa que no hubo una muy buena respuesta con la droga a esa dosis, sin embargo al aumentar la dosis de la tintura a 200 y 300 mg/kg se produjo un mejor resultado llegándose a tener un efecto más próximo al producido por el patrón, lo que se puede deber a la presencia de flavonoides encontrados en la droga, a los cuales se le

atribuyen propiedades antiinflamatorias, debido a la inhibición de la fosfolipasa A2, a la 5-lipoxigenasa, o a la COX, que influyen en la inhibición de la síntesis de PGs (37), causantes del dolor, fiebre y tumefacción(10), lo que explicaría el comportamiento similar entre la dosis de 300 mg/kg y la Indometacina. La acción antiinflamatoria podría relacionarse también a la presencia de esteroides encontrados en la droga de Llantén los cuales inhiben la liberación de ácido araquidónico de las reservas de fosfolípidos y así bloquean la liberación de leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos (38). Con el blanco se dieron variaciones, disminuyendo esta fase en el último día de tratamiento, esta situación podría deberse a la respuesta inmune desencadenada por el organismo del ratón como mecanismo de defensa frente a la agresión producida(6).

El porcentaje del número de observaciones de ratones con dolor intenso durante los siete días de tratamiento se aprecia en la figura 3.4:

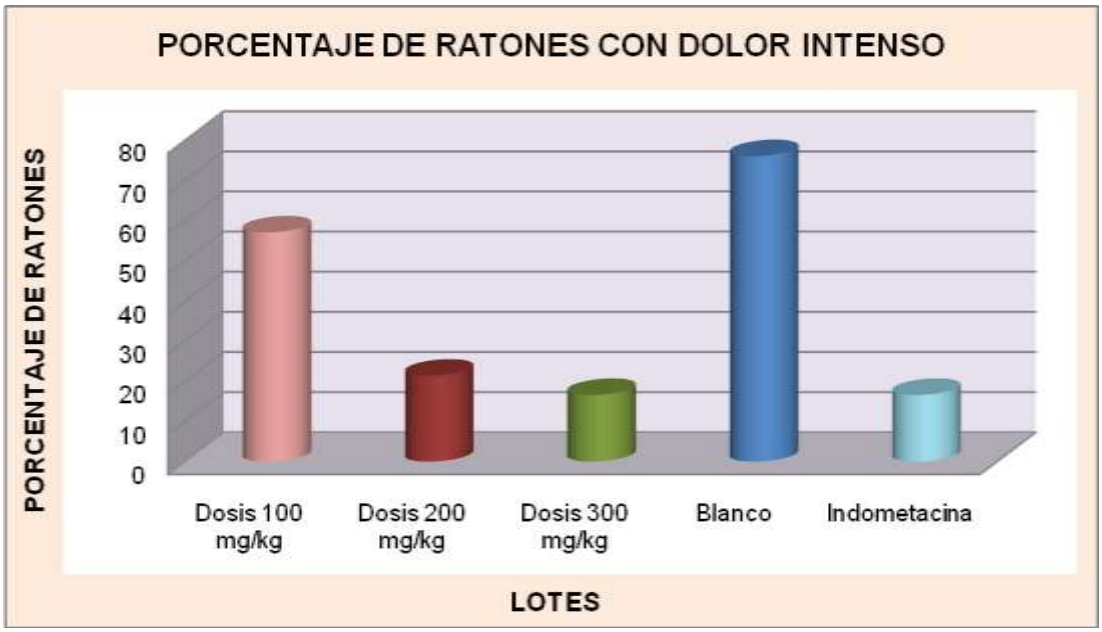


Figura 3.4.- Histograma del porcentaje de ratones con dolor intenso basado en la observación diaria del tratamiento con PmL, Blanco e Indometacina.

Interpretación de resultados:

De acuerdo al histograma 3.4, se puede observar que en el lote tratado con la dosis de 100 mg/kg el dolor intenso estuvo presente en 57,1% de ratones de este lote al final del tratamiento, mientras que con las dosis de 200 y 300 mg/kg se apreció esta fase en un 21,4 y 16,6% de ratones de cada lote respectivamente. Estas últimas dosis tienen un efecto similar al producido por la Indometacina, lo cual se explicó anteriormente, destacándose principalmente la inhibición de las PGs disminuyendo así el proceso doloroso

ya que se conoce que éstas sensibilizan las terminales nerviosas periféricas localizadas en el sitio de la inflamación lo que hace que se transmita la respuesta dolorosa (11).

La manifestación de tumefacción en los ratones se presenta en la tabla 3.13:

TUMEFACCIÓN INTENSA – DOSIS DE 100, 200 Y 300 mg/kg

FRENTE AL BLANCO Y AL PATRÓN DE INDOMETACINA

DROGA Y DOSIS	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7
PmL 100 mg/kg	4 de 6	5 de 6	5 de 6	2 de 6	2 de 6	1 de 6	0 de 6
PmL 200 mg/kg	3 de 6	3 de 6	3 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6
PmL 300 mg/kg	2 de 6	1 de 6	1 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6
Blanco	5 de 6	6 de 6	3 de 6	3 de 6	2 de 6	2 de 6	4 de 6
Indometacina	2 de 6	1 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6	0 de 6

TABLA 3.13.- Tumefacción intensa en los ratones tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, comparada con el Blanco y con el Patrón de Indometacina.

El proceso diario de la evolución de la tumefacción intensa con el tratamiento de las dosis de tintura, con el blanco y el patrón se presenta en la figura 3.5:

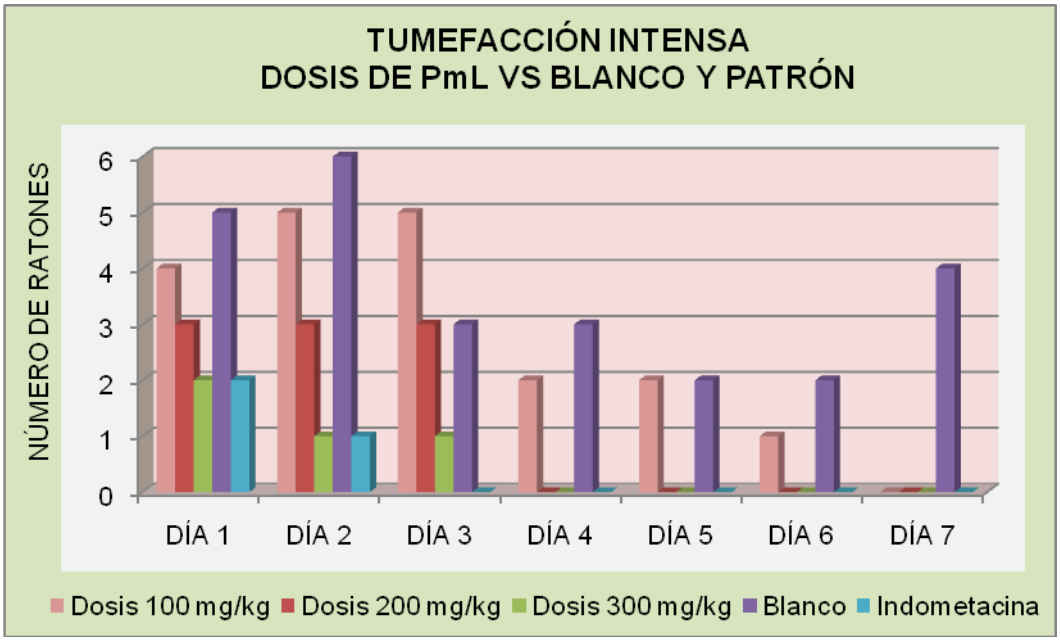


FIGURA 3.5.- Histograma del parámetro tumefacción intensa de las dosis de PmL frente al Blanco y al Patrón de Indometacina.

Interpretación de Resultados:

El histograma anterior muestra que la tumefacción intensa disminuyó a medida que aumentó la dosis de la tintura,

obteniéndose un mejor resultado con las dosis de 200 y 300 mg/kg, siendo esta última la que más se asemeja al patrón, lo cual indica que la droga de PmL disminuyó la respuesta sistémica del proceso inflamatorio, en donde participan varios sistemas y metabolitos que generan vasodilatación local, trasudación de líquidos, formación de edema, aumento de la temperatura local y aflujo de células de la sangre hacia el tejido afectado (6), lo que explicaría también lo sucedido con los demás parámetros de la inflamación como calor, rubor, y dolor. Este efecto se puede deber a los metabolitos antes mencionados a los cuales se les refiere propiedades antiinflamatorias. Por el contrario la dosis de 100 mg/kg produjo una menor disminución de la tumefacción presentándose en seis de los siete días de tratamiento. Con el blanco al igual a lo ocurrido en el dolor no se aprecia respuesta favorable, ya que la tumefacción se mantiene durante los siete días.

El porcentaje del número de observaciones de ratones con dolor intenso durante los siete días de tratamiento se aprecia en la figura 3.6:

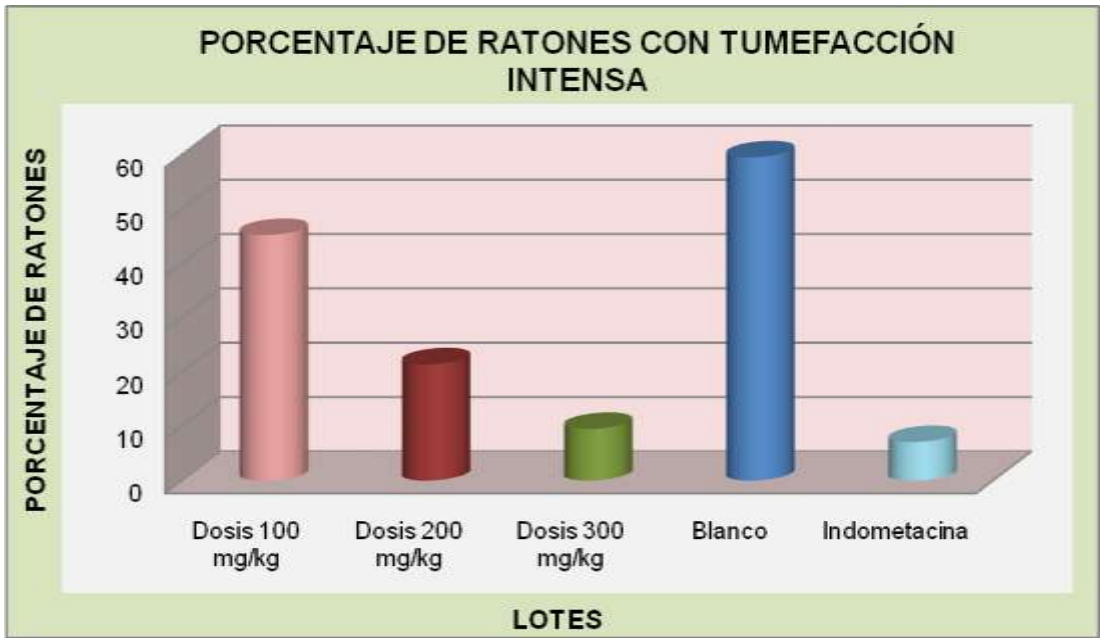


Figura 3.6.- Histograma del porcentaje de ratones con tumefacción intensa basado en la observación diaria del tratamiento con PmL, Blanco e Indometacina.

Interpretación:

Al analizar la figura 3.6, se observa que las dosis de 200 y 300 mg/kg disminuyeron favorablemente la tumefacción, siendo esta última dosis la que produjo una respuesta más cercana al patrón, manifestándose este parámetro en un 9.5% de ratones de este lote, lo que indica que la droga de PmL si posee metabolitos con actividad antiinflamatoria. En cambio el lote que fue tratado con la dosis de 100 mg/kg no tuvo una buena respuesta, siendo esta dosis insuficiente para tratar la tumefacción, el cual se apreció en un 45,2%

de ratones, ya que esta dosis presentó un resultado cercano al blanco (59,5%).

3.2.1.2. ANÁLISIS DE PROPORCIONES

El análisis de proporciones de los parámetros de la inflamación se basó en la fase intensa (+++), ya que permite un mejor estudio de las estimaciones cualitativas para determinar si hay una significación estadística en nuestra investigación farmacológica (ANEXO 22). Los resultados del análisis de proporciones de los parámetros de la inflamación se indican en las siguientes tablas:

DESARROLLO DE RUBOR EPIDÉRMICO

DROGA Y DOSIS	N	n	es(p)	Límite Superior	Límite Inferior	Significación Estadística
PmL 100 mg/kg	42	27	0,055	0,75	0,533	Si
PmL 200 mg/kg	42	5	0,136	0,385	-0,122	Si
PmL 300 mg/kg	42	8	0,125	0,435	0,055	Si
Indometacina	42	5	0,136	0,385	-0,122	Si

TABLA 3.14.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Rubor Epidérmico

Interpretación:

Mediante el análisis de la tabla anterior se puede observar que los valores obtenidos para es(p) "error del estimador" se encontraron dentro de los límites superior e inferior, lo cual demuestra que el estudio "in vivo" realizado en ratones al administrarles las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de la tintura de Llantén, en lo que se refiere al parámetro rubor tiene significación estadística, lo que indica que existe un efecto farmacológico al utilizar esta droga.

DETECCIÓN DE LA MEDIDA DEL CALOR LOCAL

DROGA Y DOSIS	N	n	es(p)	Límite Superior	Límite Inferior	Significación Estadística
PmL 100 mg/kg	42	19	0,085	0,619	0,285	No
PmL 200 mg/kg	42	6	0,133	0,403	-0,118	Si
PmL 300 mg/kg	42	9	0,122	0,453	-0,025	Si
Indometacina	42	5	0,136	0,385	-0,122	Si

TABLA 3.15.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Calor Local

DETERMINACIÓN DEL DOLOR LOCAL

DROGA Y DOSIS	N	n	es(p)	Límite Superior	Límite Inferior	Significación Estadística
PmL 100 mg/kg	42	24	0,066	0,700	0,441	No
PmL 200 mg/kg	42	9	0,122	0,453	-0,025	Si
PmL 300 mg/kg	42	7	0,129	0,418	-0,086	Si
Indometacina	42	7	0,129	0,418	-0,086	Si

TABLA 3.16.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Dolor Local

DESARROLLO DE TUMEFACCIÓN LOCAL

DROGA Y DOSIS	N	n	es(p)	Límite Superior	Límite Inferior	Significación Estadística
PmL 100 mg/kg	42	19	0,085	0,619	0,285	No
PmL 200 mg/kg	42	9	0,122	0,453	-0,025	Si
PmL 300 mg/kg	42	4	0,14	0,369	-0,179	Si
Indometacina	42	3	0,144	0,354	-0,212	Si

TABLA 3.17.- Resultados obtenidos de acuerdo al análisis de proporciones de las 3 dosis de PmL – Tumefacción Local

Interpretación:

Luego de realizar el análisis de proporciones se puede observar que las dosis de 200 y 300 mg/kg de PmL tienen significación estadística, lo que quiere decir que el tratamiento que recibieron los ratones de estos lotes produjo un efecto farmacológico que ayudó a disminuir significativamente los parámetros de calor, dolor y tumefacción, lo que no ocurre con la dosis de 100 mg/kg, ya que ésta al no tener una significación estadística no presenta el efecto manifestado por las otras dosis. Tanto es así que por ejemplo en referencia a los ratones que mostraron inhibición del dolor en la evolución del proceso antiinflamatorio inducido, dio como resultado que a la dosis de 100 mg/kg hubo un comportamiento muy alejado de las expectativas de mejoría. Esto es que de 42 observaciones, más de la mitad (24), dieron sensibilidad al estímulo álgico, lo que significa que no hubo un buen aporte de la droga a esa dosis. Sin embargo, a las dosis crecientes de 200 y 300 mg/kg, el cambio de comportamiento antiálgico fue muy interesante, llegando incluso a presentar un similar comportamiento al de la Indometacina.

3.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO

La determinación del efecto antiinflamatorio por la mota de algodón se realizó mediante la introducción de manera subcutánea de un pellet estéril de algodón, a los ratones previamente pesados e identificados; al octavo día se realizó la exéresis de los granulomas determinándose sus pesos húmedos y sus pesos secos, datos con los cuales se procedió a calcular el contenido acuoso y fibrogranuloso obteniéndose los resultados que se indican en la tabla 3.18:

Donde:

CA: Contenido acuoso CFG: Contenido fibrogranuloso

CA = Peso húmedo – Peso seco CFG = Peso seco – Peso pellet de algodón

Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición tanto del contenido acuoso como fibrogranuloso, el cual se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la inflamación} = \frac{\text{CA (blanco)} - \text{CA problema}}{\text{CA (blanco)}} \times 100\ (\%)$$

$$\text{Inhibición de la inflamación} = \frac{\text{CFG (blanco)} - \text{CFG problema}}{\text{CA (blanco)}} \times 100\ (\%)$$

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO Y FIBROGRANULOSO						
	N° de ratón	**Peso algodón (mg)**	**Peso húmedo (mg)**	**Peso seco (mg)**	**CA (mg)**	**CFG (mg)**
LOTE 1	I	15,1	197	31,2	165,8	16,1
	II	15,1	149,5	31,8	117,7	16,7
	III	14,9	157,4	26,3	131,1	11,4
	IV	15,1	146,2	23,2	123	8,1
100 mg/kg	V	15	160,4	19,7	140,7	4,7
	VI	15,2	134,3	25,4	108,9	10,2
				Media aritmética:	**131,2**	**11,2**
LOTE 2	I	14,9	144,9	17,4	127,5	2,5
	II	15,1	139,4	18,05	121,3	2,9
	III	14,9	155	18,7	136,3	3,8
	IV	15,2	150,4	16,9	133,5	1,7
200 mg/kg	V	14,5	131,3	19,2	112,1	4,7
	VI	15,1	124,2	17,5	106,7	2,4
				Media aritmética:	**122,9**	**3,0**
LOTE 3	I	15,2	139,8	16,1	123,7	0,9

300 mg/kg	II	14,8	142	15,3	126,7	0,5
	III	15,2	123,5	20,3	103,2	5,1
	IV	15,1	132,2	17,2	115	2,1
	V	14,8	103,2	19,1	84,1	4,3
	VI	14,9	128,1	17,6	110,5	2,7
				Media aritmética:	**110,5**	**2,6**

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO Y FIBROGRANULOSO						
	N° de ratón	**Peso algodón (mg)**	**Peso húmedo (mg)**	**Peso seco (mg)**	**CA (mg)**	**CFG (mg)**
LOTE 4 Blanco Alcohol en suero	I	14,9	171,4	32	139,4	17,1
	II	15	184,9	33,6	151,3	18,6
	III	15	182,1	37,8	144,3	22,8
	IV	15,1	156,7	27,4	129,3	12,3

10 mg/kg	V	14,9	176,2	32,7	143,5	17,8
	VI	14,8	177,1	33,1	144	18,3
				Media aritmética:	**141,9**	**17,8**
LOTE 5 Patrón Indometacina 10 mg/kg	I	15,1	104,5	15,6	91,9	0,5
	II	14,9	78,2	18,1	70,1	3,2
	III	14,9	92,1	15,2	79,9	0,3
	IV	14,9	89,3	16,3	79	1,4
	V	14,8	123,5	18	105,5	3,2
	VI	15	97,5	16,2	85,3	1,2
				Media aritmética:	**85,2**	**1,6**

TABLA 3.18.- Resultados de los contenidos acuoso y fibrogranuloso de los ratones**.**

CONTENIDO ACUOSO COMPARADO CON EL BLANCO Y EL PATRÓN DE INDOMETACINA

CONTENIDO ACUOSO		
N° DE LOTE	**DROGA Y DOSIS**	**MEDIA ARITMÉTICA (mg)**
Lote 1	PmL 100 mg/kg	131,2
Lote 2	PmL 200 mg/kg	122,9
Lote 3	PmL 300 mg/kg	110,5
Lote 4	Blanco	141,9
Lote 5	Indometacina	85,2

TABLA 3.19.- Contenido acuoso de las dosis de PmL frente al Blanco y al patrón de Indometacina.

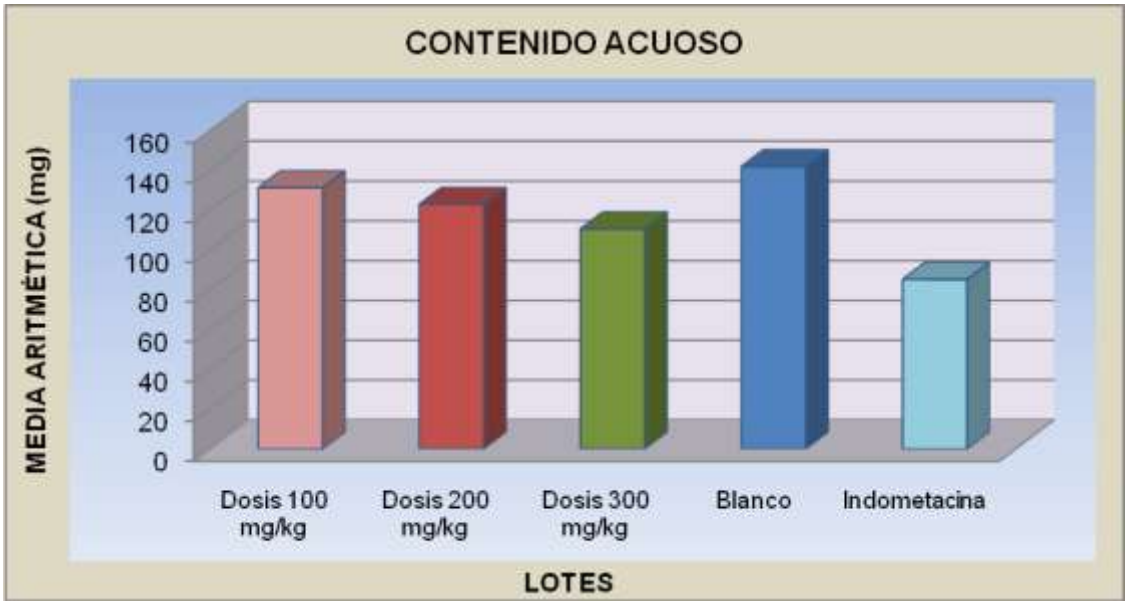


FIGURA 3.7.- Histograma del Contenido Acuoso frente al Blanco y al patrón de Indometacina

Interpretación de Resultados:

La presencia de contenido acuoso en el sitio de implantación del algodón indica la acción de la sustancia a evaluar a nivel del edema en la inflamación(31), el cual puede ser debido a un posible incremento de la acción de las PGs y LcTs en donde los primeros actúan como vasodilatadoras y los segundos aumentan la permeabilidad capilar.(10)

De acuerdo a esta apreciación en el histograma 3.7 se puede observar que los ratones de los lotes 1, 2 y 3 tratados con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg respectivamente presentaron un contenido acuoso menor (disminución del edema) al blanco, lo cual significa que la droga tiene actividad antiinflamatoria, la cual es mayor a medida que la dosis aumenta. En cambio, esta acción es menor al compararla con la Indometacina, llegando a ser la dosis de 300 mg/kg la que posee un efecto antiinflamatorio más cercano al patrón.

CONTENIDO FIBROGRANULOSO COMPARADO CON EL BLANCO Y EL PATRÓN DE INDOMETACINA

CONTENIDO FIBROGRANULOSO		
N° DE LOTE	**DROGA Y DOSIS**	**MEDIA ARITMÉTICA (mg)**
Lote 1	PmL 100 mg/kg	11,2

Lote 2	PmL 200 mg/kg	3
Lote 3	PmL 300 mg/kg	2,6
Lote 4	Blanco	17,8
Lote 5	Indometacina	1,6

TABLA 3.20.- Contenido Fibrogranuloso de las dosis de PmL frente al Blanco y al patrón de Indometacina.

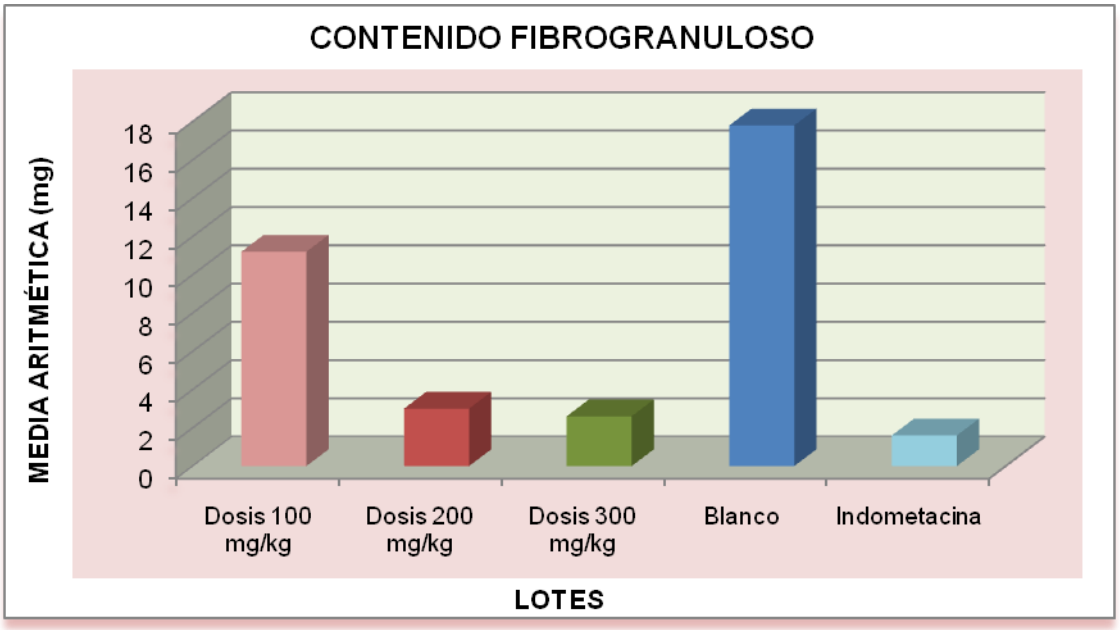


FIGURA 3.8.- Histograma del Contenido Fibrogranuloso frente al Blanco y al patrón de Indometacina

Interpretación de Resultados:

La presencia de contenido fibrogranuloso en el lugar de aplicación de la mota de algodón está relacionada con la cantidad de tejido conectivo presente en el sitio de inflamación en donde hay la existencia de células.(31)

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, mediante la figura anterior se puede apreciar que los lotes que fueron tratados

con las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, presentaron un contenido fibrogranuloso menor al blanco especialmente las dosis de 200 y 300 mg/kg. Siendo estas dosis las que presentaron un contenido similar al de la Indometacina. Estos resultados alcanzados apuntan hacia un efecto antiinflamatorio por parte de la droga de PmL, lo cual puede deberse a una inhibición en la liberación del ácido araquidónico bloqueando así la liberación de LcTs los cuales producen aumento de la permeabilidad vascular. (38).

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN FRENTE AL BLANCO Y A LA INDOMETACINA

INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN COMPARACIÓN CON EL BLANCO					
Blanco	**DROGA Y DOSIS**	**CA (mg)**	**% de Inhibición**	**CFG (mg)**	**% de Inhibición**
Alcohol en suero 10 mg/kg	PmL 100 mg/kg	131,2	7,5	11,2	37,07
	PmL 200 mg/kg	122,9	13,3	3	83,1
	PmL 300 mg/kg	110,5	22,1	2,6	85,3
	Indometacina	85,2	39,9	1,6	91,01
	Blanco	141,9	-	17,8	-

TABLA 3.21.- Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco y a la Indometacina.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO FRENTE AL BLANCO Y LA INDOMETACINA

CONTENIDO ACUOSO % DE INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN VS EL BLANCO		
N° DE LOTE	**DROGA Y DOSIS**	**%**
Lote 1	PmL 100 mg/kg	7,5
Lote 2	PmL 200 mg/kg	13,3
Lote 3	PmL 300 mg/kg	22,1
Lote 5	Indometacina	39,9
Lote 4	Blanco	-

TABLA 3.22.- Contenido acuoso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco y a la Indometacina.

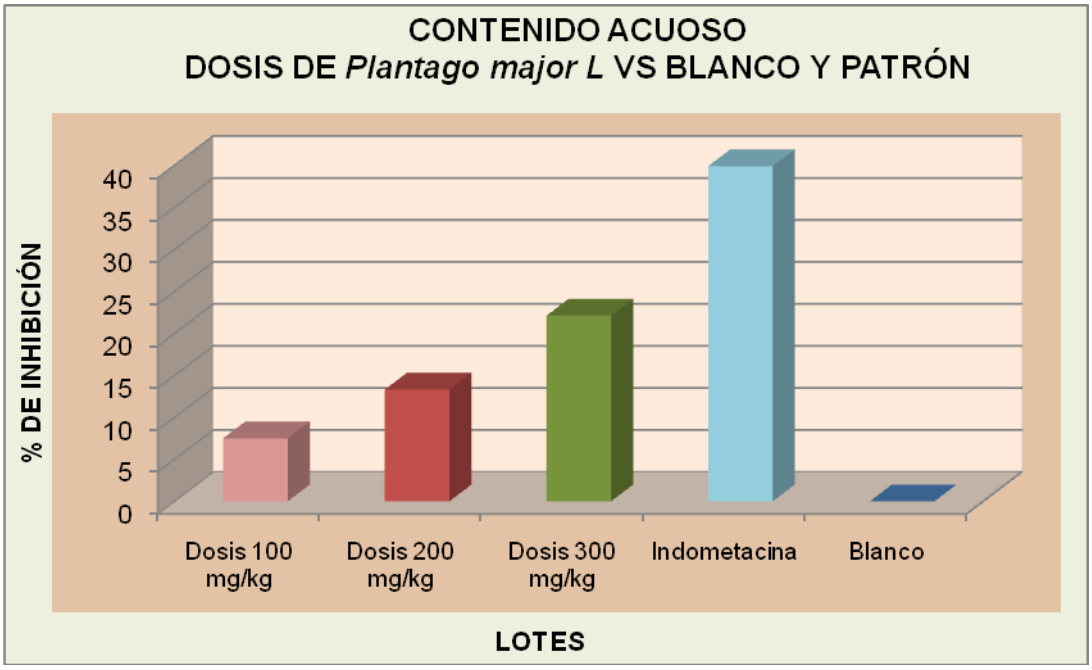


FIGURA 3.9- Histograma de Inhibición de la Inflamación del Contenido Acuoso con las dosis de PmL frente al Blanco y al Patrón.

Interpretación de Resultados:

El histograma 3.9 permite observar que las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de PmL. inhiben la inflamación en un 7,5, 13,3 y 22,1% respectivamente, lo que indica que existe un mayor efecto antiinflamatorio, evidenciándose una mejor respuesta al aumentar las dosis. Se observa también que la inhibición se produjo con mayor efecto al utilizar la dosis de 300 mg/kg y presentó un efecto más aproximado a la Indometacina (39,9%); Esta actividad antiinflamatoria evidencia un buen mecanismo de control de la inflamación semejante a los resultados encontrados por otros autores al emplear este modelo experimental de granuloma inducido por algodón en el estudio de otras plantas medicinales, por ejemplo las investigaciones realizadas por: Migdalia Rodríguez y colaboradores(31), Vivian del Pilar Rosales (37) y Otros (39), (40), en donde se sugiere la inhibición de PGs y LcTs como parte de la actividad antiinflamatoria ejercida por otras especies vegetales. Como resultado final se tendría que la droga de PmL inhibe la vasodilatación así como la permeabilidad vascular que contribuye a la

formación de edema, lo que explicaría su efecto similar al producido por la Indometacina al haber una inhibición del contenido acuoso.

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CONTENIDO FIBROGRANULOSO FRENTE AL BLANCO Y LA INDOMETACINA

CONTENIDO FIBROGRANULOSO % DE INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN VS BLANCO Y PATRÓN		
N° DE LOTE	**DROGA Y DOSIS**	**%**
Lote 1	PmL 100 mg/kg	37,07
Lote 2	PmL 200 mg/kg	83,1
Lote 3	PmL 300 mg/kg	85,3
Lote 5	Indometacina	91,01
Lote 4	Blanco	-

TABLA 3.23.- Contenido Fibrogranuloso - Porcentaje de Inhibición de la Inflamación frente al Blanco.

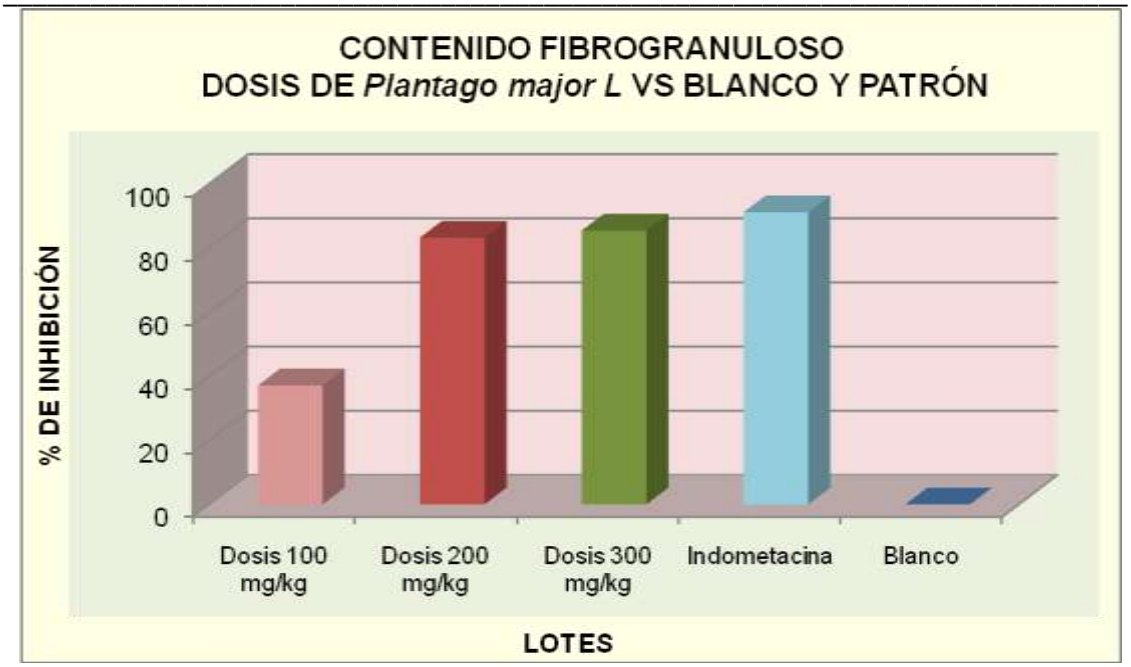


FIGURA 3.10.- Histograma de Inhibición de la Inflamación del Contenido Fibrogranuloso con las dosis de PmL frente al Blanco y al Patrón.

Interpretación de Resultados:

Al analizar la gráfica anterior se evidencia que en el contenido fibrogranuloso existió una inhibición de la inflamación igual que en el contenido acuoso por parte de todas las dosis y el patrón de Indometacina. Además se observa que las dosis de 200 y 300 mg/kg tienen una inhibición de la inflamación de 83,1 y 85,3% cercana al fármaco de referencia (91,01%), lo cual puede deberse a lo que se explicó anteriormente, a una inhibición en la liberación del ácido araquidónico con lo cual se bloquea la

liberación de LcTs, que son los que producen aumento de la permeabilidad vascular y promueven la adherencia leucocitaria lo cual se manifiesta con una mayor inhibición del contenido fibrogranuloso.

Los valores obtenidos de los porcentajes de inhibición de la inflamación indican que hubo una acción antiinflamatoria por parte de la droga de PmL, la cual se manifestó con una disminución tanto del contenido acuoso y fibrogranuloso. Sin embargo esta inhibición es menor en el contenido acuoso, lo cual podría deberse a que las sustancias activas ejercieron una menor actividad en la inhibición de PGs; en cambio hay mayor inhibición del contenido fibrogranuloso lo cual podría deberse a una mayor actividad sobre mediadores que producen adherencia leucocitaria pudiendo ser estos metabolitos los esteroides, ya que al parecer tienen la capacidad de inhibir la reunión y migración de leucocitos y monocitos hacia el área afectada, además de que inhiben la elaboración de una variedad de sustancias quimiotácticas y de factores que incrementan la permeabilidad vascular y la vasodilatación.(13)

3.2.2.2. PRUEBA T DE STUDENT

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA - DOSIS DE *Plantago major L.* FRENTE AL BLANCO

FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Ho: El efecto farmacológico de las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso de la tintura de *Plantago major L* es similar al observado con el blanco.

H1: El efecto farmacológico de las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso de la tintura de *Plantago major L* es superior al observado con el blanco.

PRUEBA T DE STUDENT - DOSIS DE 100, 200 Y 300 mg/kg

CONTENIDO ACUOSO

Droga y dosis	P (Propabilidad)	Significación estadística	Aceptación de hipótesis
PmL	P>0,05	NO	Aceptación

100mg/kg			de Ho
PmL 200mg/kg	P<0,05	SI	Rechazo de Ho
PmL 300mg/kg	P<0,05	SI	Rechazo de Ho

TABLA 3.24.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al Blanco - Contenido Acuoso

Interpretación de Resultados:

Al realizar el análisis de la t de student para las dosis de Llantén se determina que el efecto farmacológico a partir de la dosis de 200 mg/kg de PmL es superior al observado con el blanco, como consecuencia una dosis mayor como la de 300 mg/kg también tendrá un efecto antiinflamatorio superior. Con respecto a la dosis de 100 mg/kg, ésta no presenta diferencias significativas en comparación con el blanco por lo cual, se deduce que su efecto farmacológico es similar al observado en este lote.

PRUEBA T DE STUDENT - DOSIS DE 100, 200 Y 300 mg/kg

CONTENIDO FIBROGRANULOSO

Droga y	P	Significación	Aceptación

dosis	(Propabilidad)	estadística	de hipótesis
PmL 100mg/kg	P<0,05	SI	Rechazo de Ho
PmL 200mg/kg	P<0,05	SI	Rechazo de Ho
PmL 300mg/kg	P<0,05	SI	Rechazo de Ho

TABLA 3.25.- Prueba T de Student para las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg frente al Blanco - Contenido Fibrogranuloso

Interpretación de Resultados:

Mediante el estudio estadístico para el contenido fibrogranuloso, se observa que a partir de la dosis de 100 mg/kg hay diferencias estadísticamente significativas. Este resultado demuestra que el efecto farmacológico producido por la droga de PmL es superior al blanco.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES:

1. Al evaluar el efecto farmacológico de la tintura a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg sobre los parámetros de la inflamación como el calor, dolor, rubor, tumefacción y disminución o pérdida del funcionamiento se observó que a partir de la dosis de 200 mg/kg se produjo un mejor efecto antiinflamatorio, sobre todo con la dosis de 300 mg/kg, lo cual se comprobó al realizar el análisis estadístico del contenido acuoso y fibrogranuloso.

2. Los valores obtenidos en la técnica de granuloma inducido por discos de algodón indican que la tintura de Llantén al 30% empleada a razón de 100 mg/kg produce una menor inhibición de la inflamación puesto que disminuyó el contenido acuoso en un 7,5% en comparación con un 39,9% de la producida por la Indometacina. Con el contenido fibrogranuloso ejerció

una inhibición del 37,07% frente a un 91,01% del patrón; lo que demuestra que el proceso inflamatorio a esta dosis no manifestó una buena posibilidad de mejoría.

3. Con la dosis de 200 mg/kg se obtuvo un porcentaje de inhibición del contenido acuoso de un 13,3%. Con el contenido fibrogranuloso esta dosis alcanzó una inhibición del 83,1%; llegando a tener esta dosis un efecto cercano a la Indometacina; lo cual indica que la actividad antiinflamatoria de la tintura de PmL a esta dosis presenta una moderada acción farmacológica, es decir que los parámetros de la inflamación disminuyen de manera significativa al pasar de los días, más no se consigue una mejoría absoluta de los mismos.

4. La dosis de 300 mg/kg fue la que evidenció un efecto antiinflamatorio similar al de la Indometacina presentando una inhibición del contenido acuoso de un 22,1% y del contenido fibrogranuloso de un 85,3%, por lo que podemos considerar que a ésta dosis la tintura resulta ser la más efectiva, demostrando que es

capaz de mejorar el proceso inflamatorio de una manera muy semejante al patrón.

5. Finalmente se aceptó la hipótesis planteada al inicio de la investigación determinándose que la tintura al 30% de *Plantago major L* si tiene metabolitos con propiedad antiinflamatoria, pudiendo ser éstos los flavonoides y esteroides, a los primeros se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, debido a la inhibición de la fosfolipasa A2, a la 5-lipoxigenasa, o a la COX, que influyen en la inhibición de la síntesis de PGs, causantes del dolor, fiebre y tumefacción lo que explicaría el comportamiento similar entre la dosis de 300 mg/kg y la Indometacina; mientras que los esteroides encontrados en la droga de Llantén inhiben la liberación de ácido araquidónico de las reservas de fosfolípidos y así bloquean la liberación de leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos además de que impiden la reunión y migración de leucocitos y monocitos hacia el área afectada.

4.2. RECOMENDACIONES:

1. A más de las propiedades antiinflamatorias del *Plantago major L* se deben valorar otras propiedades referidas a esta planta como el efecto cicatrizante debido a que posee Taninos a los cuales se cree se bebe este efecto.

2. Determinar el efecto antiinflamatorio de otras especies vegetales que no hayan sido debidamente estudiadas, para conocer su contribución en el campo de la medicina tradicional.

3. Cuantificar los principios activos con actividad antiinflamatoria del Llantén como son los flavonoides y los esteroides puros y utilizando diferentes dosis comparar el efecto frente a la Indometacina, para establecer si presentan un comportamiento similar o superior al patrón.

ANEXOS

ANEXO 1

LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL LUGAR DONDE SE TOMO
LA MUESTRA DEL LLANTEN (Plantago major)
Sta Teresita
Río Amarillo
Ulises Chacón
RÍO TOMEBAMBA
Ciudad de Cuenca
TOMA DE LA MUESTRA DE LLANTEN
San Joaquín
Universidad de Cuenca
Rafael Arízaga
Cem
A Farfán
La Florida
2892
2632
Canal
RÍO YANUNCAY
Hushil
Sta Teresita de Misicata
Joel Monroy
Cordero Crespo
Loma Misicata
Yanuncay Grande
Leoncio Cordero
N
S
E
W
714500
715000
715500
716000
716500
717000
717500
718000
718500
719000
9681500
9681000
9680500
9680000
9679500
9679000
9678500
1
0
1
2 Kilometers
Ubicación
Leyenda
MUESTRA
CURVAS DE NIVEL
RIOS Y QUEBRADAS
VIAS

ANEXO 2

IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA

Cuenca, 5 de octubre de 2009

Dra. Raffaella Ansaloni, Encargada del Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y profesora de Botánica en la Escuela de Bioquímica y Farmacia

Certifico

Que el espécimen entregado por las Señoritas Diana Patricia Carpio Plaza y Lourdes Elizabeth Ramón Mora corresponde a la siguiente especie:

Nombre común: Llantén

Nombre científico: *Plantago major L.*

Familia: *Plantaginaceae*

Atentamente,

Raffaella Ansaloni

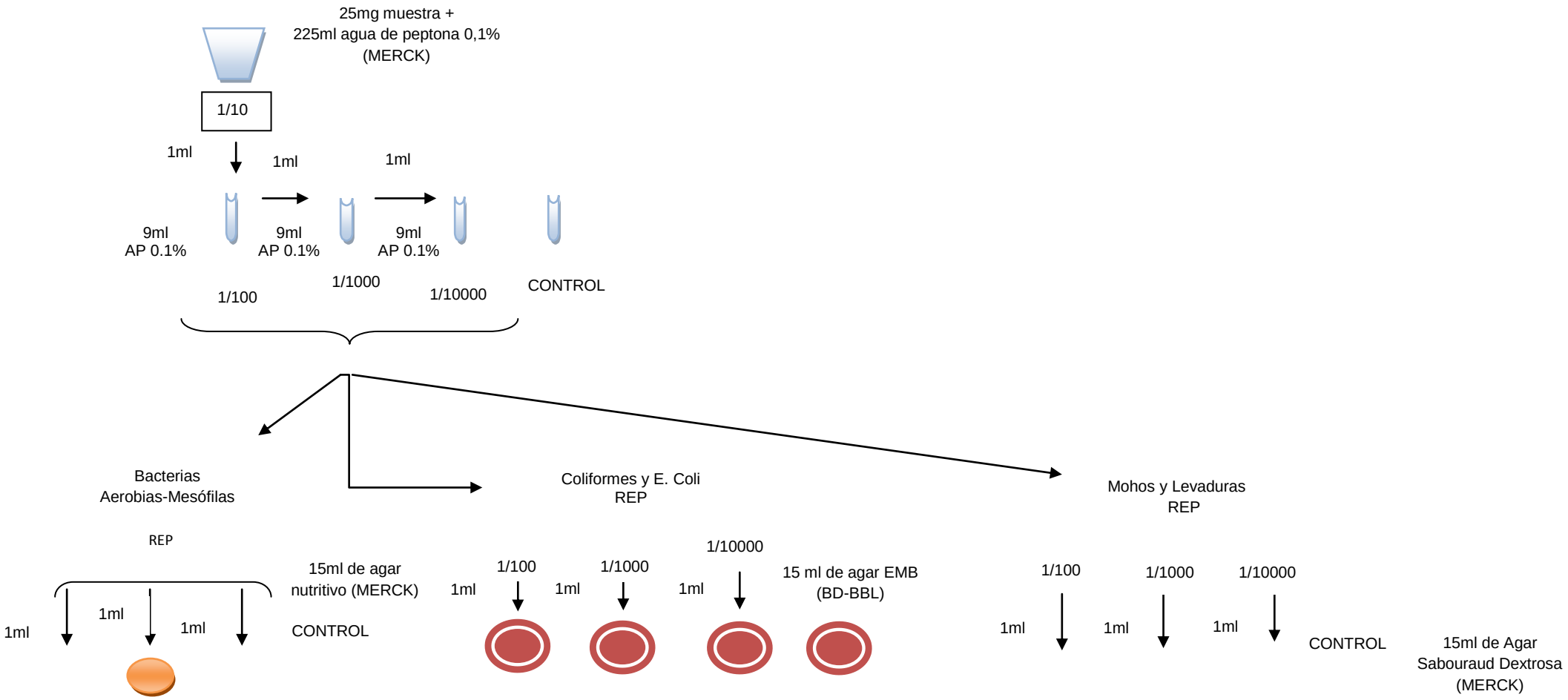
ANEXO 3

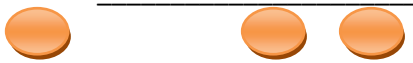
SECADO DE LA PLANTA

Tiempo de secado: 12 horas
Temperatura de secado: 36°C

ANEXO 4

FLUJOGRAMA INTEGRADO DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO





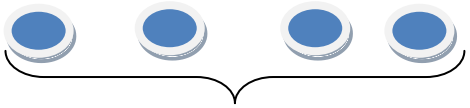
1/100 1/1000 1/10000

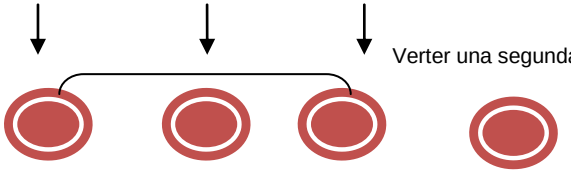
V

Homogenizar
Incubar a 37°C x 24-48 h. Estufa FANEM 002 CB - Brasil (37 - 56 °C)

Esperar a que solidifique

CONTROL





Verter una segunda capa de agar EMB

Incubar a 22°C por 5-8 días
Estufa MEMMERT BKE 40 (Alemania)

Contaje por número de colonias
Resultado:
Se expresa en UPC/g muestra

Incubar a 35° C x 24-48 h para coliformes t IEM 002/2 CB -Brasil (37 - 56 °C)

Resultado se expresa en UFC/ g muestra

Incubar a 45 ,5 ° C x 24-48 h para coliformes fecales. Estufa FANEM 002/2 CB -Brasil (37 - 56 °C)

Prueba confirmatoria

CONTROL

Inocular las colonias que presenten un color rojo amoratado rodeado de un halo rojizo en dos tubos con 10 ml de caldo Bilis y verde brillante. Incubar a 37 ° C X 24-48 h

ANEXO 5

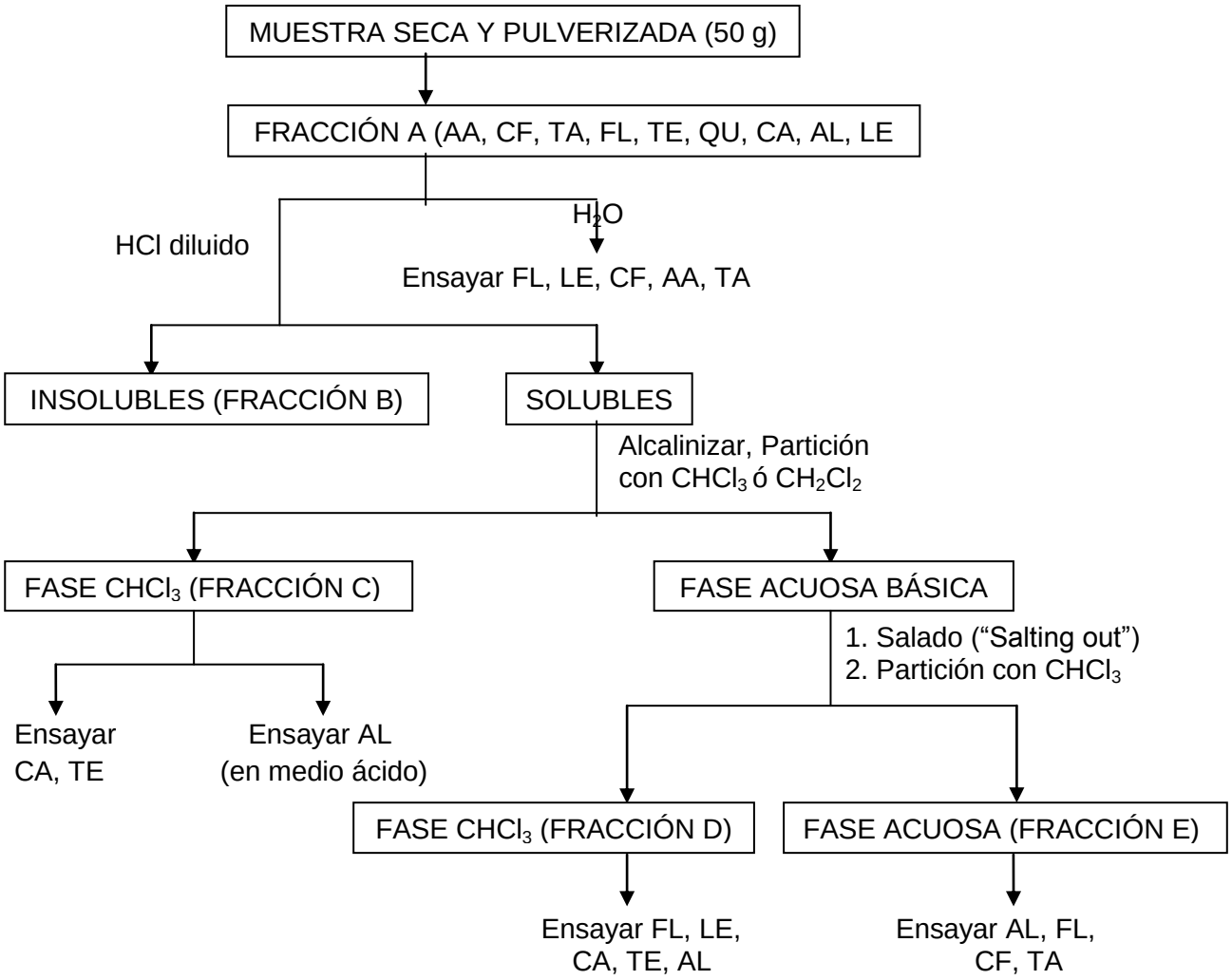
CONVENCIONES EMPLEADAS EN LA MARCHA FITOQUÍMICA

AA = AMINOÁCIDOS
CF = COMPUESTOS FENÓLICOS
TA = TANINOS
FL = FLAVONOIDES
TE = TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES
QU = QUINONAS
CA = CARDIOTÓNICOS
AL = ALCALOIDES
LE = LEUCOANTOCIANINAS

Tomado de: MARTINEZ M, Alejandro; Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; Universidad de Antioquía. Facultad de Química y Farmacia; Medellín Colombia; 2008; pág: 82-86.

ANEXO 6

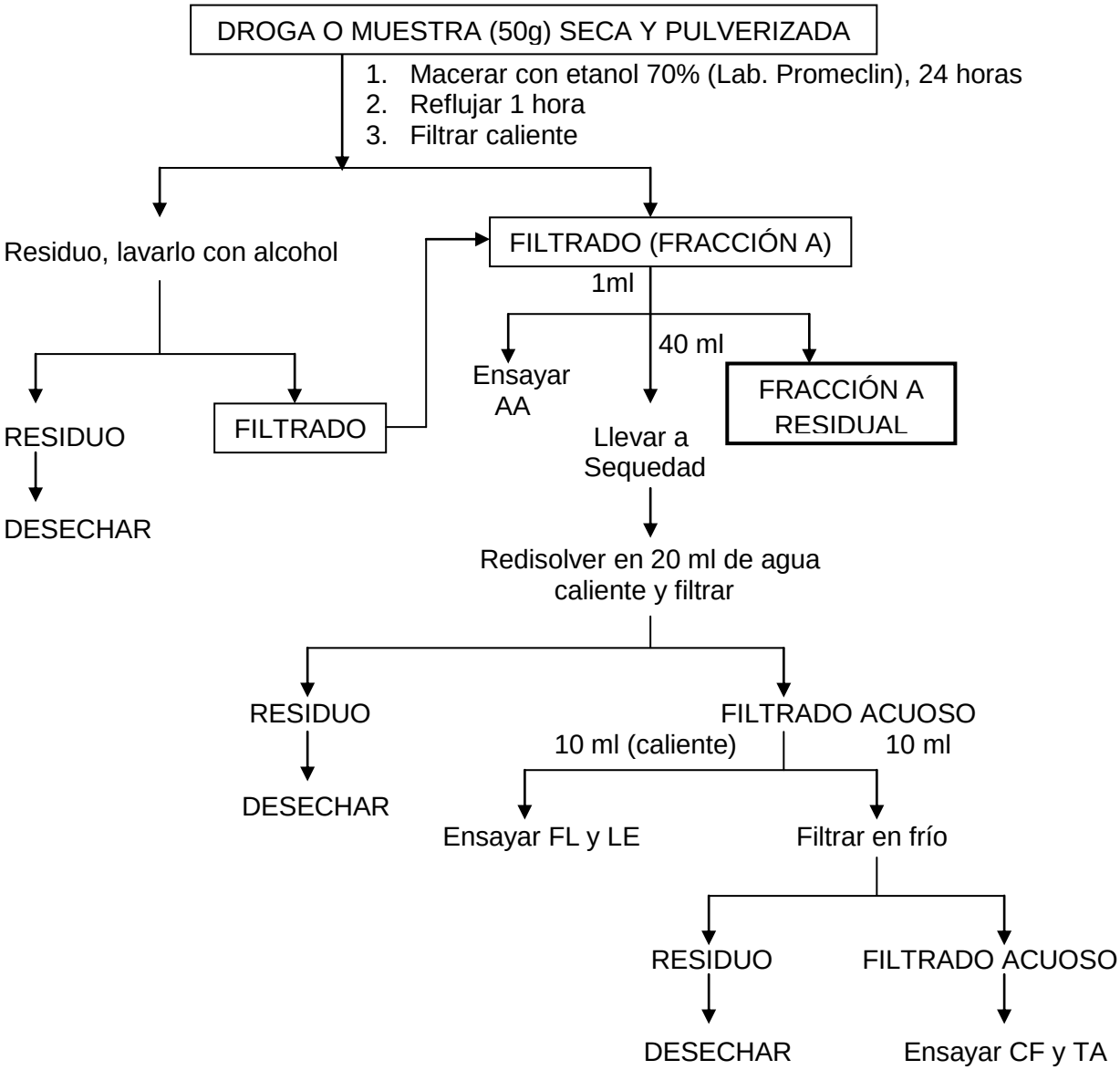
FLUJOGRAMA DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO



Tomado de: MARTINEZ M, Alejandro; Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; Universidad de Antioquía. Facultad de Química y Farmacia; Medellín Colombia; 2008; pág: 82-86.

ANEXO 7

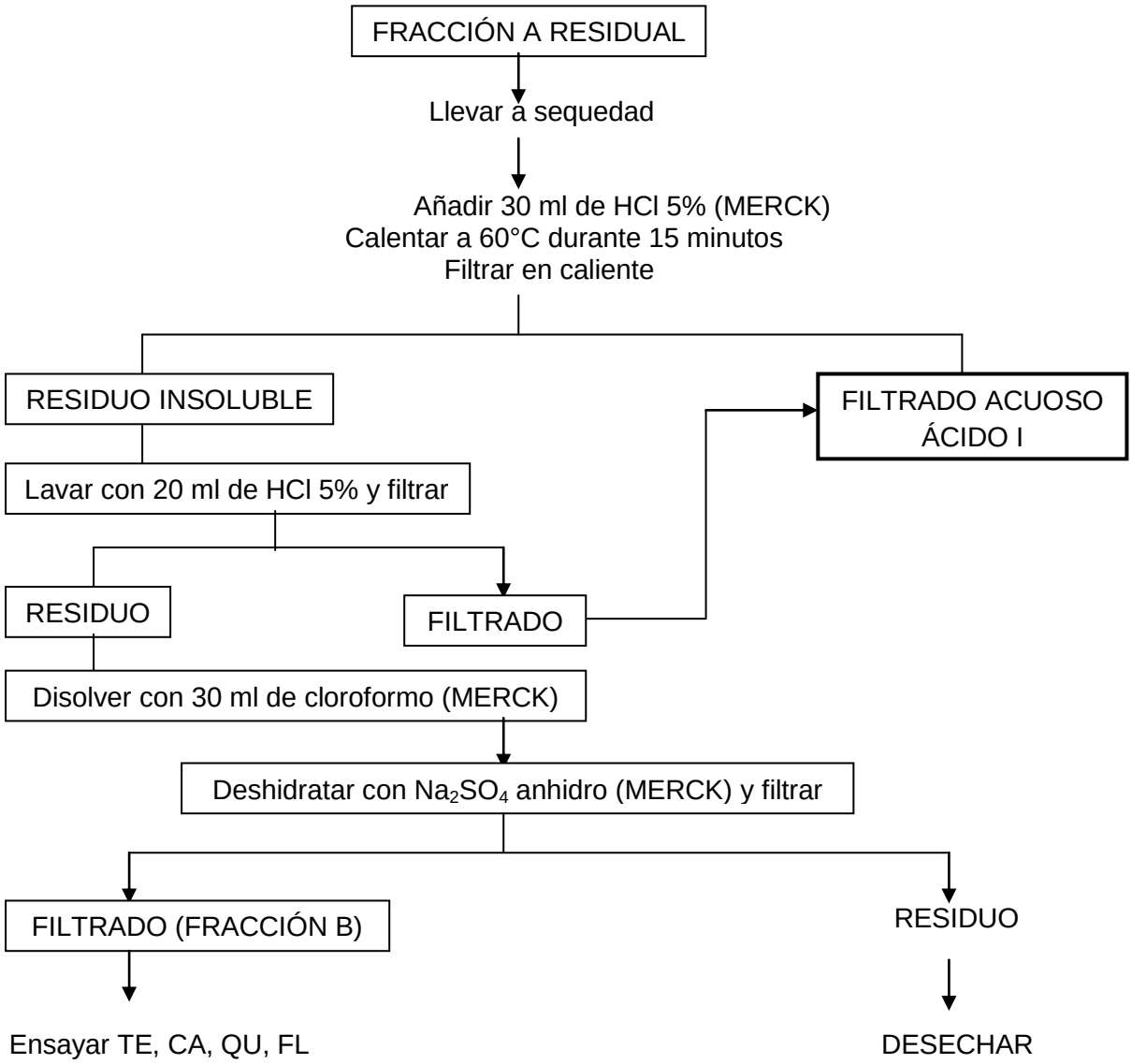
OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN A



Tomado de: MARTINEZ M, Alejandro; Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; Universidad de Antioquía. Facultad de Química y Farmacia; Medellín Colombia; 2008; pág: 82-86.

ANEXO 8

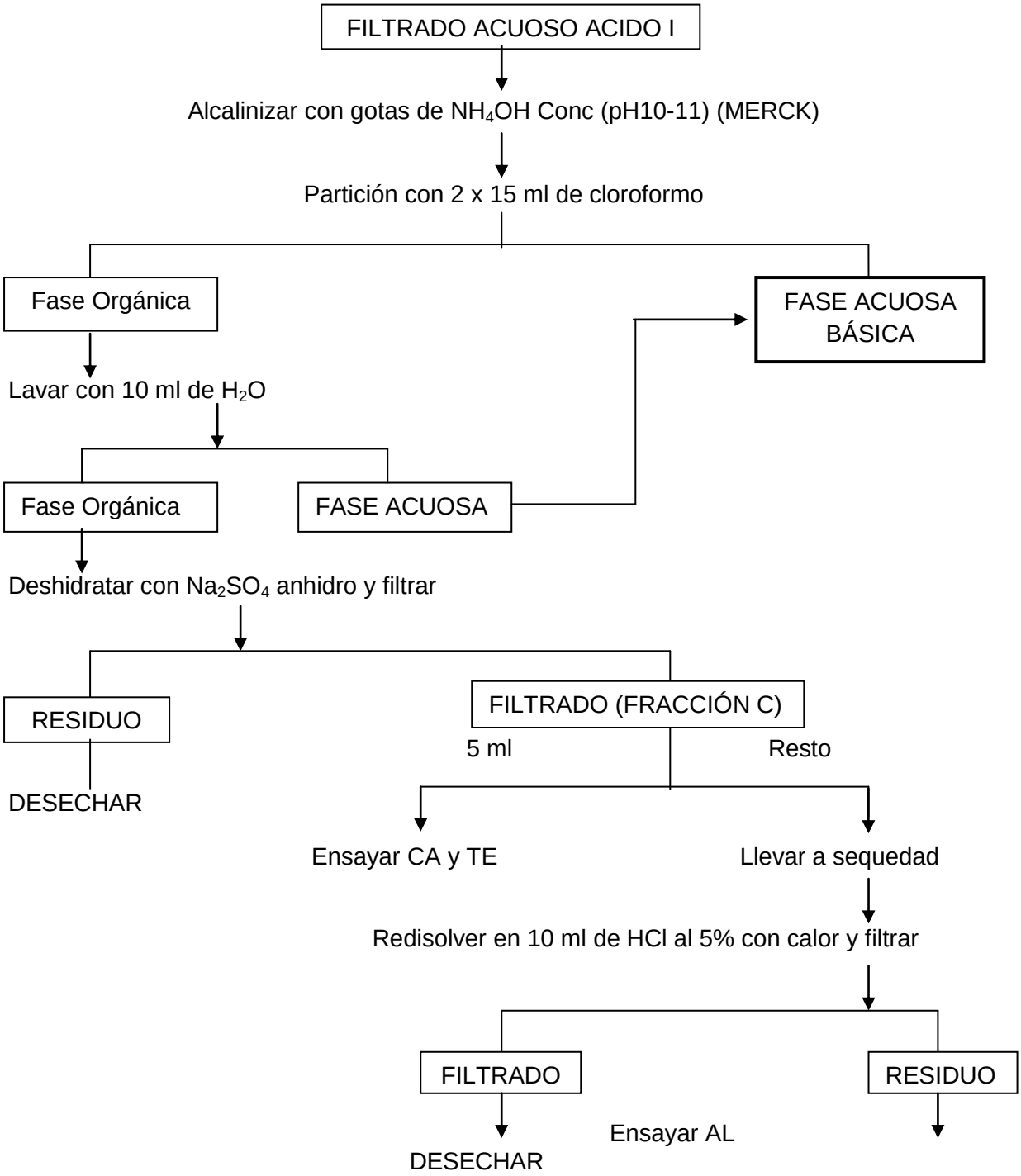
ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES A RESIDUAL Y B



Tomado de: MARTINEZ M, Alejandro; Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; Universidad de Antioquía. Facultad de Química y Farmacia; Medellín Colombia; 2008; pág: 82-86.

ANEXO 9

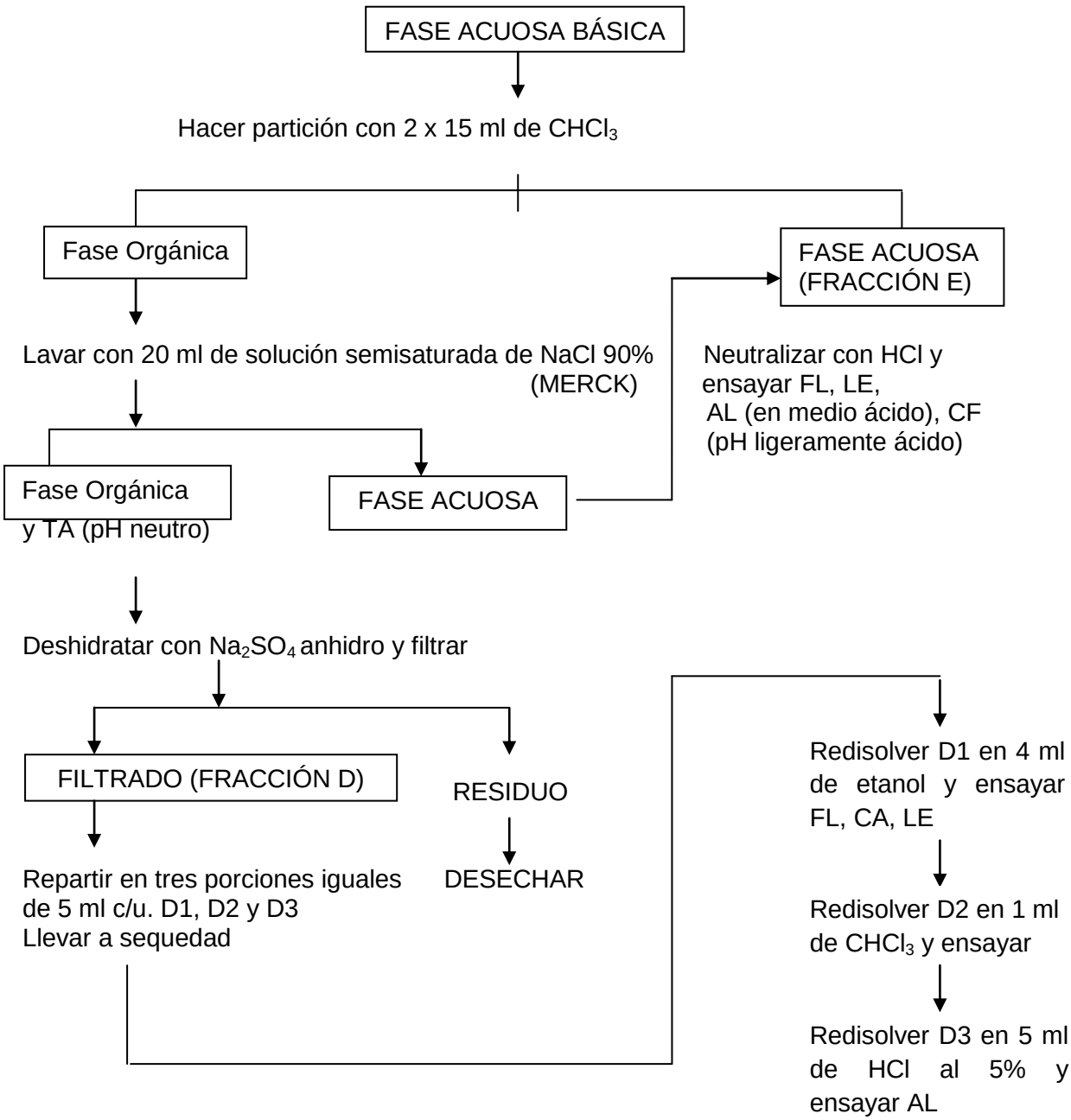
OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN C



Tomado de: MARTINEZ M, Alejandro; Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; Universidad de Antioquía. Facultad de Química y Farmacia; Medellín Colombia; 2008; pág: 82-86.

ANEXO 10

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS FRACCIÓNES D Y E



Tomado de: MARTINEZ M, Alejandro; Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica; Universidad de Antioquía. Facultad de Química y Farmacia; Medellín Colombia; 2008; pág: 82-86

ANEXO 11

PREPARACIÓN DE LA TINTURA AL 30% DE *PLANTAGO MAJOR L*

DOSIS DE 100, 200 y 300 mg/kg DE TINTURA AL 30%

ANEXO 12

CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE LAS DOSIS DE 100, 200 Y 300 mg/kg A PARTIR DE LA TINTURA AL 30% DE PLANTAGO MAJOR

Pesamos 30 g de muestra esto pasamos a mg para la realización de los cálculos:

LOTE 1 → DOSIS DE 100mg/kg

30.000 mg 100 ml 0.333ml 1000 g

100mg X X 27.33 g (peso del ratón 1 del lote 1)

X = 0.333 ml/kg X= 0.0091 ml

- 1 ml (tintura) + 24 ml (suero fisiolog.) = 25ml de sol

1ml tintura 25 ml solución

0.0091ml X = 0.227ml de solución que se le administró al ratón 1 del lote 1

LOTE 2 → DOSIS DE 200 mg/kg

30.000 mg 100 ml 0.666 ml 1000 g

200 mg X X 25.2 g (peso del ratón 1 del lote 2)

X= 0.666 ml/kg X= 0.0167 ml

- 2 ml (tintura) + 23 ml (suero fisiolog.) = 25ml de sol

2 ml tintura 25 ml solución

0.0167 ml X = 0.209 ml de solución que se le administró al ratón 1 del lote 2.

LOTE 3 → DOSIS DE 300 mg/kg

30.000 mg 100 ml 1 ml 1000 g

300 mg X X 24.4 g (peso del ratón 1 del lote 3)

X= 1 ml/kg X= 0.0244 ml

- 2 ml (tintura) + 23 ml (suero fisiolog.) = 25ml de sol

2 ml tintura 25 ml solución

0.0244 ml X = 0.305 ml de solución que se le administró al ratón 1 del lote 3.

LOTE 4 → BLANCO (10 mg/kg) ALCOHOL EN SUERO FISIOLÓGICO

ALCOHOL AL 94%

94.000 mg 100 ml 0.010638 ml 1000 g

10 mg X X 25.6 g (peso del ratón 1 del lote 4)

X = 0.010638 ml X = 0.00027 ml

0.1 ml 50 ml solución

0.00027 ml X = 0.135 ml de solución que se le administró al ratón 1 del lote 4.

LOTE 5 → INDOMETACINA (10 mg/kg)

INDOCID Cápsulas de 25 mg

25mg 100 ml 10ml 1000 g

10 mg X X 28.7 g (peso del ratón 1 del lote 3)

X= 10 ml/kg X= 0.287 ml de solución que se le administró al ratón 1 del lote 5

ANEXO 13

ACTIVIDADES REALIZADAS PREVIO AL ANÁLISIS FARMACOLÓGICO

VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN CON AZUL DE METILENO

Administración del azul de metileno

Disección de la cavidad abdominal

ANEXO 14

ACTIVIDADES REALIZADAS PREVIO AL ANÁLISIS FARMACOLÓGICO

PRÁCTICA DE LA TÉCNICA

Depilado del lomo del ratón

Introducción del pellet de algodón

Suturación de la herida

ANEXO 15

MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMACIÓN

GRANULOMA INDUCIDO POR DISCO DE ALGODÓN

Pesado de los ratones

Identificación de los ratones

Distribución de los ratones en lotes

Depilado de los ratones

Incisión del dorso lateral

Introducción del pellet de algodón

Suturación de la herida

Aplicación de antiséptico

ANEXO 16

ADMINISTRACIÓN DE LAS TINTURAS, BLANCO Y PATRÓN DE INDOMETACINA

Tintura a dosis de 100 y 200 mg/kg

Tintura a dosis de 300 mg/kg y el Blanco

Indometacina

Administración de las dosis

Administración de la Indometacina

Dosis de 200 mg/kg

ANEXO 17

OBSERVACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN

Rubor

Tumefacción

Rubor y Tumefacción

Ratones con rubor y tumefacción

ANEXO 18

EXTRACCIÓN DE LOS GRANULOMAS

ANEXO 19

PESADO DE LOS GRANULOMAS

Granuloma Húmedo

Granuloma Seco

Pesado de los Granulomas

ANEXO 20

METABOLITOS ENCONTRADOS EN *PLANTAGO MAJOR L*

Aminoácidos - Fracción A

Taninos y Compuestos fenólicos Fracción A

Triterpenos y/o Esteroides - Fracción B

Leucoantocianinas y Flavonoides Fracción E

Alcaloides - Fracción E

ANEXO 21

RESULTADO DE LA VALORACIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Exploración física interna

ANEXO 22

PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE PROPORCIONES

RUBOR

DROGA Y DOSIS	N	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	N
PmL 100 mg/kg	42	4+++ 2++	5+++ 1++	5+++ 1++	4+++ 2++	3+++ 3++	3+++ 3++	3+++ 3++	27
PmL 200 mg/kg	42	2+++ 4++	2+++ 4++	1+++ 5++	5++ 1+	4++ 2+	4++ 2+	4++ 2+	5
PmL 300 mg/kg	42	3+++ 3++	3+++ 3++	2++ 1+++ 3+	1+++ 3++ 2+	3++ 3+	1++ 5+	6+	8
Blanco	42	6+++	6+++	2+++ 4++	4+++ 2++	5+++ 1++	5+++ 1++	2+++ 4++	30

Indometacina	42	3+++ 3++	2+++ 4++	5++ 1+	6+	6+	6+	2- 4+	5

CALOR

DROGA Y DOSIS	N	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	n
PmL 100 mg/kg	42	4+++ 2++	3+++ 3++	3+++ 3++	3+++ 3++	3+++ 3++	2+++ 4++	1+++ 5++	19
PmL 200 mg/kg	42	3+++ 3++	2+++ 4++	1+++ 5++	6++	6++	6++	5++ 1+	6
PmL 300 mg/kg	42	4+++ 2++	3+++ 3++	2+++ 4++	4++ 2+	2++ 4+	1++ 5+	6+	9
Blanco	42	4+++	4+++	2+++	4+++	3+++	5+++	2+++	24

		2++	2++	4++	2++	3++	1++	4++	
Indometacina	42	3+++ 3++	2+++ 4++	4++ 2+	6+	6+	4+ 2-	2+ 4-	5

PARÁMETROS DE LA INFLAMACIÓN UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE PROPORCIONES

DOLOR

DROGA Y DOSIS	N	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	n
PmL 100 mg/kg	42	4+++ 2++	4+++ 2++	4+++ 2++	4+++ 2++	4+++ 2++	2+++ 4++	2+++ 4++	24
PmL 200 mg/kg	42	3+++ 3++	3+++ 3++	2+++ 4++	1+++ 5++	4++ 2+	4++ 2+	4++ 2+	9

PmL 300 mg/kg	42	3+++ 3++	3+++ 3++	1+++ 3++ 2+	6++	3++ 3+	3++ 3+	1++ 5+	7
Blanco	42	4+++ 2++	5+++ 1++	4+++ 2++	6+++	5+++ 1++	5+++ 1++	3+++ 3++	32
Indometacina	42	4+++ 2++	3+++ 3++	6++	6+	6+	4+ 2-	1+ 5-	7

TUMEFACCIÓN

DROGA Y DOSIS	**N**	**DÍA 1**	**DÍA 2**	**DÍA 3**	**DÍA 4**	**DÍA 5**	**DÍA 6**	**DÍA 7**	**n**
PmL 100 mg/kg	42	4+++ 2++	5+++ 1++	5+++ 1++	2+++ 4++	2+++ 4++	1+++ 5++	6++	19
PmL 200	42	3+++	3+++	3+++ 3++	6++	4++	4++	4++	9

mg/kg		3++	3++			2+	2+	2+	
PmL 300 mg/kg	42	2+++ 4++	1+++ 5++	4++ 1+++ 1+	5++ 1+	1++ 5+	6+	6+	4
Blanco	42	5+++ 1++	6+++	3+++ 3++	3+++ 3++	2+++ 4++	2+++ 4++	4+++ 2++	25
Indometacina	42	2+++ 4++	1+++ 5++	4++ 2+	5+ 1-	5+ 1-	4+ 2-	2- 4+	3

BIBLIOGRAFÍA

1. **Navarro Guillermo, Ruth Fabiola.** Comprobación del efecto cicatrizante de peperomia scutellaefolia R.et.P., aspectos Etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. [En línea] 2002. [Citado el: 04 de Agosto de 2009.] http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2002/.../guillermo_nr-TH.back.1.pdf.

2. **Cucufate Rivas, Cruz Marina y Rodriguez Portillo, Ana Beatriz.** UNIVERSIDAD NUEVA SAN SALVADOR (UNSSA). [En línea] Julio de 2005. [Citado el: 04 de Agosto de 2009.] http://www.unssa.edu.sv/.../TINTURA%20DE%20APIO.PDF -.

3. **Rios, M., y otros.** *Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, retos y perspectivas.* Primera edición. Quito : Abya-Yala, 2007. págs. 17, 111.

4. **Gabay, C., Kushner, I, y Engl, N.** *Mecanismos de enfermedades: Bases, Proteínas y otros sistemas responsables de la Inflamación.* Décimo tercera edición. 1999. págs. 448-454.

5. **Castro del Pozo, S. y Pérez Arellano, José Luis.** *Manual de Patología General.* Sexta edición. s.l. : Elsevier, 2006. pág. 82.

6. **Rojas M, William.** *Inmunología.* Décimo tercera edición. Bogotá : Quebecor Word, 2004. págs. 79,80,94.

7. Imágenes Inflamación. [En línea] [Citado el: 26 de Octubre de 2009.] http://www.kalipedia.com/kalipediamedia/cienciasnaturales/media/200704/17/delavida/20070417klpcnavid_219.Ees.SCO.png.

8. Reacciones básicas de la inflamación. [En línea] [Citado el: 17 de Agosto de 2009.] http://www.fisioterapia.cl/files/generalidades/cls%20inflamacion%20y%20reparacion%20tisular.pdf.

9. **Celada, A.** 25 Inflamación. [En línea] [Citado el: 07 de Mayo de 2009.] http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema25/etexto25.htm.

10. Inflamación. [En línea] [Citado el: 06 de Agosto de 2009.] http://es.wikipedia.org/wiki/inflamación.

11. **Torres, Jorge E y Granados, Vinicio.** Universidad y Ciencia. PARTICIPACIÓN DE LA CICLO-OXIGENASA-1 EN EL DOLOR INFLAMATORIO. [En línea] Diciembre de 2001. [Citado el: 10 de Diciembre de 2009.] http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/154/15403403.pdf.

12. **Mindan Pardo, J. F.** Anatomía Patológica. [En línea] 1996. [Citado el: 16 de Mayo de 2009.] http://books.google.com.ec/books?id=Xkpq2rCQfcEC&pg=PA119&dq=que+es+la+inflamación+subaguda.

13. **Samaniego, Edgar.** *Fundamentos de Farmacología médica.* [ed.] Jorge Vera. Sexta edición. Quito : s.n., 2005. págs. 440,448, 693.

14. Tema 22 Farmacología de la inflamación y el dolor. [En línea] [Citado el: 18 de Agosto de 2009.] http://personal.telefonica.terra.es/web/jramonl77/pasatiempos/tema%2022.pdf.

15. Imagen: Estructura básica de la Indometacina. [En línea] [Citado el: 9 de Noviembre de 2009.] http://upload.wikimedia.org/.../3/3b/Indometacina.png.

16. Ciclooxigenasa. [En línea] [Citado el: 12 de Noviembre de 2009.] http://www.2.uah.es/farmamol/Visual_3D/.../cox_2.html.

17. **Wesley, G., y otros.** *Farmacología Clínica: Derivados del Indol (Indometacina).* Décimo segunda edición. s.l. : Médica Panamericana, 1990. pág. 304.

18. **Merck Sharp Dohme de México, S.A. de C.V.** Indometacina. [En línea] 2004. [Citado el: 11 de Noviembre de 2009.] http://www.libreriamedica8a.com/productos/2079.htm.

19. Imagen: Plantago major L. [En línea] 23 de Noviembre de 2009. http://luirig.altervista.org/flora/plantago.htm.

20. **Cañigueral, Salvador y Vanaclocha, Bernat.** *Fitoterapia: Vademécum de Prescripción.* Cuarta edición. s.l. : Elsevier. págs. 74-77.

21. **Blanco, Bárbara, Saborío, Adriana y Garro, Giovanni.** Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de Plantago major (llantén mayor). [En línea] Abril-Junio de 2008. [Citado el: 04 de Agosto de 2009.] http://www.tec.cr/sitios/Vicerrectoriía/vie/.../21-2%2017-24-pdf.

22. **De la Torre, L., y otros.** *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador.* Primera edición. Quito : s.n., 2008. págs. 504-505.

23. Llantén . [En línea] [Citado el: 15 de Mayo de 2009.] http://www.maca-peruana.com/llanten.htm.

24. El llantén en los remedios caseros. [En línea] [Citado el: 06 de Agosto de 2009.] http://www.remediospopulares.com/llantén.html.

25. Plantas antiinflamatorias. [En línea] [Citado el: 17 de Agosto de 2009.] http://www.mailxmail.com/curso-plantas-medicinales/plantas-anti-inflamatorias.

26. **Astudillo, Adelina.** *Manual de Prácticas de Farmacognosia.* Cuenca : s.n., 2005. págs. 8-28, 36-38.

27. **Martínez M, Alejandro.** *Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica.* Medellín : s.n., 2008. págs. 28,30,45,81-90.

28. **De la Cruz Durán, Q. Hermelinda.** Manual de Laboratorio de Farmacología. [En línea] 2008. [Citado el: 10 de Junio de 2009.] http://fcqi.tij.uabc.mx/docentes/.../Manual%20Lab%20Farmacologia.doc.

29. **L, Charles, y otros.** The evalaution of cotton twine as a new anti-inflamatory assay. [En línea] 18 de Agosto de 2005. [Citado el: 5 de Octubre de 2009.] http://www.springlink.com/index/V055623838P1P206.pdf.

30. **Sociedad Cubana de Farmacología.** 2. Taller Nacional sobre Inflamación. [En línea] Noviembre de 2001. [Citado el: 4 de Mayo de 2009.] http://www.scf.sld.cu/pdf/taller-inflamacion/2taller01/prog-resumen2taller01.pdf.

31. **Ruiz Ruiz de Zárate, Serafín.** Evaluación preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de Morinda citrIfolia L. [En línea] Octubre de 2005. [Citado el: 4 de Mayo de 2009.] http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/efecto_antiinflamatorio_morinda.pdf.

32. **Yin, Zong Zhu y colaboradores.** Effect of Boschniakia rossica on expression of GST-P, p53 and p21ras proteins in early stage of chemical hepatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats. [En línea] 2000. [Citado el: 14 de Mayo de 2009.] http://www.wjgnet.com/1007-9327/6/812.htm.

33. **Fajardo, Eufrasia.** *Desarrollo Galénico de un Vehículo Tipo Emulsión para el Protector Solar EUSOLEX 4360.* Cuenca : s.n., 2006. págs. 276-278.

34. **Martínez R, Benjamín.** Test de Student ó Test T. [En línea] [Citado el: 15 de Octubre de 2009.] http://patoral.umayor.cl/anestbas/TEST_T.html.

35. HERBARIO DIGITAL DE BANYERES DE MARIOLA. [En línea] [Citado el: 16 de Diciembre de 2009.] http://herbariodebanyeresdemariola.blogspot.com/2009_03_29_archive.html.

36. **Roig, Juan Tomás.** Desinfección Química de Plantas Medicinales ll. Plantago lanceolata L. [En línea] Julio de 2002. [Citado el: 28 de Junio de 2009.] http://www.sld.cu/revistas/pla/vol7_3_02/pla04302.pdf.

37. **Rosales, Vivian del Pilar y colaboradores.** Evaluación farmacológica de Pluchea carolinensis Jacq. (salvia de playa) en animales de experimentación. [En línea] 1999. [Citado el: 25 de Agosto de 2009.] http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla04299.htm.

38. **Cherrez, Graciela.** *PROGRAMA DE BIOQUÍMICA II.* 2006. pág. 102.

39. Efectos de los extractos acuosos de las hojas de LLantén (Plántago major). [En línea] 1985. [Citado el: 8 de Noviembre de 2009.] http://www.bvs.hn/RMH75/pdf/1985/pdf/Vol53-2-1985.pdf..

40. **Cambar, Pablo; Alger, Jacqueline; Alvarado Carlos; Zelaya Lorena; Santos, Alian; Cousin, Luis; Bacuzzi,**

Linda. Efectos de los extractos acuosos de las hojas de LLantén (Plántago major). Volumen 53. [En línea] 1985. [Citado el: 8 de Noviembre de 2009.] http://www.bvs.hn/RMH75/pdf/1985/pdf/Vol53-2-1985.pdf..